



**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**Modelos celulares de infección persistente por  
el virus de la hepatitis C revelan alteraciones  
transcriptómicas no reversibles tras la  
eliminación de la infección mediante el  
tratamiento con antivirales de acción directa**

**TESIS DOCTORAL  
Victoria Castro Illana  
Madrid, 2021**

<b>I. ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>II. SUMMARY .....</b>	<b>6</b>
<b>III. RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Aspectos clínicos de HCV .....</b>	<b>9</b>
1.1.1. Epidemiología .....	10
1.1.2. Patogénesis .....	11
1.1.3. Tratamientos frente a la infección crónica por HCV .....	14
<b>1.2. El virus de la hepatitis C .....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Organización del genoma y procesamiento de la poliproteína viral .....	17
1.2.2. Ciclo replicativo de HCV .....	19
1.2.3. Impacto de la replicación de HCV sobre la célula hospedadora .....	21
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Cultivo de líneas celulares .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Virus .....</b>	<b>26</b>
3.2.1. Virus de la hepatitis C en cultivo celular .....	26
3.2.2. Producción de stocks de virus .....	27
3.2.2.1. Producción de virus infecciosos a partir de cDNA .....	27
3.2.2.2. Producción de stocks de virus por propagación de virus infeccioso .....	28
<b>3.3. Fármacos .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4. Infecciones virales .....</b>	<b>28</b>
3.4.1. Infección persistente en células proliferativas .....	28
3.4.2. Infección persistente en células quiescentes .....	29
3.4.3. Infección de ciclo único .....	30
3.4.4. Determinación del título de infectividad extracelular mediante recuento de focos por inmunofluorescencia .....	30
<b>3.5. Detección de proteínas .....</b>	<b>31</b>
3.5.1. Anticuerpos .....	31
3.5.2. Inmunofluorescencia .....	31
<b>3.6. Análisis de RNA .....</b>	<b>32</b>
3.6.1 Extracción de RNA total y tratamiento de RNA con DNasa para la eliminación de DNA contaminante .....	32
3.6.2 Cuantificación de mRNA y RNA viral mediante RT-qPCR .....	32
<b>3.7. Secuenciación masiva de RNA total (RNA-seq) .....</b>	<b>32</b>
3.7.1. Secuenciación, alineamiento y lecturas .....	32
3.7.2. Análisis estadístico de la expresión diferencial .....	33
3.7.3 Análisis de sobrerepresentación .....	34
3.7.4. Análisis estadístico y representación gráfica. ....	34
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Erradicación de la infección persistente por HCV en cultivos celulares proliferativos y quiescentes mediante tratamiento con DAAs. ....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. Análisis de las alteraciones transcripcionales en células no infectadas por la presencia de los DAAs .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3. Existen alteraciones transcripcionales en células persistentemente infectadas por HCV antes y tras de la erradicación del virus .....</b>	<b>47</b>

<b>4.4. Los análisis de sobrerepresentación indican funciones celulares permanente alteradas tras la eliminación del virus.....</b>	<b>53</b>
4.4.1. Funciones celulares alteradas por la infección persistente de HCV comunes a cultivos celulares proliferativos y quiescentes.....	55
4.4.1.1. Categorías funcionales asociadas a replicación activa del virus que no aparecen sobrerepresentadas tras la eliminación del virus.....	55
4.4.1.2. Categorías funcionales asociadas a replicación activa del virus que permanecen sobrerepresentadas tras la eliminación del virus.....	56
4.4.1.3. Categorías funcionales asociadas a replicación activa del virus sobrerepresentadas diferencialmente tras la eliminación del virus en Huh7 <sub>pro</sub> o Huh7 <sub>DMSO</sub> .....	59
4.4.2. Categorías funcionales sobrerepresentadas exclusivamente en células proliferativas o quiescentes.....	61
<b>4.5 El análisis de los perfiles individuales de transcritos alterados por la infección por HCV sugiere diversos mecanismos por los que se establecen alteraciones permanentes .....</b>	<b>64</b>
4.5.1. Existen transcritos ligados a la replicación activa por HCV que se observan en ambos sistemas de cultivo.....	65
4.5.1.1. La mayoría de transcritos alterados por la infección por HCV vuelven a su estado basal tras la erradicación del virus.....	66
4.5.1.2. Existen transcritos alterados por la infección por HCV que permanecen permanentemente alterados tras la erradicación del virus.....	69
4.5.2. Existen transcritos alterados por la infección HCV que únicamente se observan en uno de los dos sistemas de cultivo .....	76
4.5.2.1. Transcritos alterados por la infección HCV en Huh7 <sub>pro</sub> .....	76
4.5.2.2. Transcritos alterados por la infección HCV únicamente en Huh7 <sub>DMSO</sub> .....	78
4.5.3. Existen transcritos que no codifican proteínas (ncRNAs) alterados permanentemente por la infección HCV.....	84
<b>4.6. Relevancia clínica potencial: comparación con datos de biopsias de pacientes infectados.....</b>	<b>87</b>
4.6.1 Alteraciones transcripcionales observadas en biopsias hepáticas de pacientes con infección crónica por HCV.....	87
4.6.2 Modificaciones epigenéticas permanentes observadas en biopsias de hígado de pacientes con SVR mediada por DAAs.....	96
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>117</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>136</b>

## I. ABREVIATURAS

Abreviatura	Inglés	Español
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	Álbumina de suero bovino
C-terminal	<i>Carboxyl-terminus</i>	Extremo carboxilo terminal
cDNA	<i>complementary DNA</i>	DNA complementario
DAA	<i>Direct-acting antiviral</i>	Antiviral de acción directa
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	4,6-diamino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetil sulfóxido
DMVs	<i>Double-Membrane Vesicles</i>	Vesículas de doble membrana
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>	Retículo endoplasmático
FC	<i>Fold change</i>	Veces de cambio
FDR	<i>False discovery rate</i>	Riesgo de falsos positivos
FFU	<i>Forming Focus Unit</i>	Unidad formadora de focos
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>	Hepatocarcinoma
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>	Virus de la hepatitis C
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>	Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperacini]-etanosulfónico
hpi	<i>Hours Post-Infection</i>	Horas post-infección
IFN	<i>Interferon</i>	Interferón
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>	Sitio interno de entrada al ribosoma
ISGs	<i>Interferon-stimulated gene</i>	Genes estimulados por IFN
LDs	<i>Lipid droplets</i>	Gotas lipídicas
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>	Multiplicidad de infección
mRNA	<i>messenger RNA</i>	RNA mensajero
N-terminal	<i>Amino-terminus</i>	Extremo amino terminal
ORA	<i>over-representation analysis</i>	análisis de sobrerepresentación
ORF	<i>Open reading frame</i>	Marco abierto de lectura
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>	Tampón salino con fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
peg-IFN $\alpha$	<i>Pegylated interferon alpha</i>	Interferón alfa pegilado
RBV	<i>ribavirin</i>	Ribavirina
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>	PCR cuantitativa acoplada a transcripción reversa
ssRNA+	<i>Positive-sense single-stranded RNA</i>	RNA de cadena sencilla y polaridad positiva
SVR	<i>sustained virologic response</i>	respuesta virológica sostenida
UTR	<i>Untranslated region</i>	Región no traducida
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>	lipoproteínas de muy baja densidad
WB	<i>Western Blot</i>	Western Blot



## II. SUMMARY

Hepatitis C virus infection (HCV) causes liver inflammation and fibrosis, which may lead to development severe liver disease, such as cirrhosis or hepatocellular carcinoma (HCC). In recent years, approval of direct acting antiviral (DAA) drug combinations has revolutionized the antiviral therapy against chronic HCV infection. These drugs enable virus eradication in >98% of the treated patients, regardless of the genotype and liver disease status. These treatments improve the quality of life, reduce inflammation and improve overall liver function. However, they do not fully prevent liver cancer development, indicating that eradication of the infection may not fully revert virus-induced molecular damage. Moreover, some mathematical models suggest that elimination of infected cells by reactivated immune responses may be dispensable for virus eradication due to the high efficacy of these antiviral molecules, in contrast to previously used interferon-based therapies. It is thus formally possible that patients that are declared cured, indeed carry formerly infected cells that display irreversibly altered molecular signatures due to prolonged chronic HCV infection.

Despite the fact that it would be more relevant clinically to study molecular alterations in liver biopsies of patients before and after DAA treatment-mediated virus elimination, these studies would not allow to differentiate between changes induced by the virus and those produced as a consequence of liver disease. However, cell culture systems permit isolating the phenomena directly associated with HCV infection on the host cell, eliminating the noise that comes from associated pathologies. Therefore, in this Thesis we generated two persistently infected cell culture models based on proliferative and growth-arrested cells. Once the cells were persistently infected, they were treated with a DAA combination until virus elimination. In this context, we wondered if the original homeostasis is regained in the formerly infected cells after virus eradication by determining coding and non-coding RNA transcripts by RNA-seq.

In both models, HCV infection causes profound alterations of host cell transcriptome. These alterations are related to intracellular membrane rearrangements for the formation of the replication complexes, antiviral defense mechanisms and persistent stress conditions. All these transcriptional alterations taken together induce a balance to promote both viral replication and the survival of the infected cell, thus avoiding cell apoptosis. Based on the transcriptomes of HCV-cured cells, we determined that most transcriptional alterations induced by HCV infection are reverted after virus elimination by DAA treatment. However, we observed a number of transcripts that remain altered several weeks after treatment completion and treatment withdrawal. Our results indicate that persistent HCV infection induces permanent transcriptional alterations both in growing as well as in growth-arrested cell populations, suggesting that permanent alterations may occur in the absence of cell population evolution. Depending on whether the experiments are conducted on proliferating or in quiescent-partially differentiated cells, the cured cells show a different permanent molecular signature, despite a common host cell transcriptional reprogramming during active virus replication.

We also analyzed the clinical implications of our findings and identified a subset of candidate genes altered in cell culture, which is also transcriptionally altered in liver biopsies of chronically infected patients. Moreover, another subset genes permanently altered in cell culture is associated with permanent epigenetic modifications DAA-cured HCV patients. These studies reinforce the notion that HCV infection may directly contribute to host cell epigenetic reprogramming.

Our data provide insight into liver carcinogenesis as well as molecular biomarkers that may contribute to proper patient management and follow up after virological cure.

### III. RESUMEN

La infección por el virus de la hepatitis C (HCV) causa inflamación del hígado y fibrosis, lo que puede conducir al desarrollo de una enfermedad hepática grave, como cirrosis o hepatocarcinoma (HCC). En los últimos años, la aprobación de tratamientos basados en combinaciones de antivirales de acción directa (DAAs) ha revolucionado la terapia antiviral contra la infección crónica por HCV. Estos fármacos permiten la erradicación del virus en más del 98% de los pacientes tratados, independientemente del genotipo y del estado de desarrollo de la enfermedad hepática. Estos tratamientos mejoran la calidad de vida del paciente, reducen la inflamación y mejoran la función hepática en general. Sin embargo, no previenen por completo el desarrollo del cáncer de hígado, lo que indica que la erradicación de la infección puede no revertir por completo el daño molecular inducido por el virus. Además, algunos modelos matemáticos sugieren que la eliminación de células infectadas/dañadas mediante la reactivación de la respuesta inmune puede ser prescindible para la erradicación del virus debido a la alta eficacia de los DAAs, en contraste con las terapias basadas en interferón previamente utilizadas. Por tanto, es posible que los pacientes que se declaran virológicamente curados, porten células previamente infectadas que presentan secuelas moleculares alteradas irreversiblemente debido a la infección crónica por HCV.

A pesar de que clínicamente sería más relevante estudiar las alteraciones moleculares en las biopsias de hígado de pacientes, antes y después de la eliminación del virus mediada por el tratamiento con DAAs, estos estudios no permitirían diferenciar entre los cambios inducidos por el virus y los producidos como consecuencia de la patología hepática. Sin embargo, los sistemas de cultivo celular permiten aislar los fenómenos asociados a la acción directa del virus sobre la célula hospedadora, eliminando el ruido que proviene de patologías asociadas como la fibrosis y los infiltrados inflamatorios. Por lo tanto, en esta Tesis Doctoral generamos dos modelos de cultivo celular infectados de manera persistente basados en células proliferativas y quiescentes. Una vez que las células se infectaron de forma persistente, se trataron con una combinación de DAAs hasta la erradicación del virus. En este contexto, nos preguntamos si la homeostasis original se recupera en las células anteriormente infectadas después de la eliminación del virus mediante la determinación de los transcritos de RNA codificantes y no codificantes mediante RNA-seq.

En ambos modelos, la infección por HCV provoca profundas alteraciones del transcriptoma celular. Estas alteraciones están relacionadas con reordenamientos de la membrana intracelular para la formación de los complejos de replicación, mecanismos de defensa antivirales y condiciones de estrés persistente. Todas estas alteraciones transcripcionales tomadas en conjunto inducen un equilibrio para promover tanto la replicación viral como la supervivencia de la célula hospedadora, evitando así la apoptosis celular. Basándonos en el transcriptoma de las células curadas, determinamos que la mayoría de las alteraciones transcripcionales inducidas por la infección por HCV se revierten después de la eliminación del virus mediante el tratamiento con DAAs. Sin embargo, observamos una serie de transcritos que permanecen alterados varias semanas después de la finalización del tratamiento y la retirada del mismo. Nuestros resultados indican que la infección persistente por HCV induce alteraciones transcriptómicas permanentes tanto en poblaciones de células proliferativas como quiescentes, lo que sugiere que pueden producirse alteraciones permanentes en ausencia de evolución de la población celular. Dependiendo de si los experimentos se llevan a cabo en células proliferativas o quiescentes, las células curadas muestran unas secuelas moleculares permanentes diferentes, a pesar de una reprogramación transcripcional de la célula hospedadora común durante la replicación activa del virus.

También analizamos las implicaciones clínicas de nuestros hallazgos e identificamos un subconjunto de genes candidatos alterados en cultivo celular, que también está alterado transcripcionalmente en biopsias de hígado de pacientes con infección crónica. Además, otro subconjunto de genes alterados permanentemente en cultivo celular se asocia con modificaciones epigenéticas permanentes en pacientes con HCV curados con DAAs. Estos estudios refuerzan la noción de que la infección por HCV puede contribuir directamente a la reprogramación epigenética de la célula hospedadora. Nuestros datos proporcionan información sobre la carcinogénesis hepática, así como biomarcadores moleculares que pueden contribuir al manejo adecuado del paciente y al seguimiento después de la cura virológica.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Aspectos clínicos de HCV

El virus de la hepatitis C (HCV; del inglés *hepatitis C virus*) fue identificado en 1989 como agente etiológico de la hepatitis no-A, no-B (Choo et al. 1989). Se estima que hasta en un 85% de los pacientes la infección se establece de manera crónica, mientras que el resto de personas infectadas sufren una infección aguda y, salvo en raros casos de hepatitis fulminante, eliminan el virus espontáneamente sin apenas signos clínicos de infección. La infección crónica por HCV se asocia con el desarrollo de patologías hepáticas como inflamación del hígado (hepatitis) acompañada de fibrosis y, en una fracción de los pacientes con complicaciones graves como la cirrosis o el cáncer de hígado o hepatocarcinoma (HCC; del inglés *hepatocellular carcinoma*). Tanto la cirrosis descompensada como el cáncer de hígado asociado a HCV constituyen las causas más comunes de trasplante de hígado a nivel mundial (Verna & Brown 2006).

Se estima que existen 71 millones de personas infectadas de manera crónica en el mundo y cada año mueren unas 400 000 personas debido a la infección por HCV, principalmente por cirrosis y carcinoma hepático. HCV se transmite a través de la sangre, ya sea por reutilización de jeringuillas y agujas para consumo de drogas inyectables (P. K. Nelson et al. 2011), por prácticas sexuales de riesgo (Bradshaw et al. 2013) o esterilización inadecuada de material médico. También se puede transmitir de la madre infectada a su hijo, aunque esta forma de transmisión es menos frecuente. Además un gran número de las infecciones crónicas actuales se deben a las transfusiones que se produjeron en la época de los 80 del siglo XX, cuando el virus no había sido aún identificado (Feinstone et al. 1975; Kuo et al. 1989).

La prevalencia media de HCV a nivel global se sitúa entorno al 2% de la población. Dependiendo del área geográfica, la infección por HCV puede concentrarse en algunos grupos de población de riesgo como los consumidores de drogas inyectables o a los reclusos, grupos a los que hasta hace poco no se incluía en los programas nacionales de control y erradicación (Stone et al. 2018).

Por el momento no existe una vacuna eficaz contra HCV. Esto se debe por un lado a la enorme diversidad genética del virus, ya que bajo el nombre HCV se engloba un conjunto heterogéneo de virus agrupados en 7 genotipos con diferentes subtipos y, por otro lado, a la limitada eficacia de los anticuerpos neutralizantes para controlar y prevenir la (re)infección. Sin vacunas, la prevención únicamente depende de la reducción del riesgo de exposición al virus en el entorno sanitario y en los grupos de población de alto riesgo. Un dato alarmante

en este ámbito es el alto número de nuevos casos de infección por HCV aguda a nivel mundial, incluso en áreas del planeta donde deberían existir medidas efectivas para evitar su propagación como en los Estados Unidos de América (Ryerson et al. 2020).

Hasta 2014, el tratamiento más efectivo para la infección crónica consistía en la combinación de interferón- $\alpha$  pegilado (peg-IFN- $\alpha$ ) y ribavirina durante 48 semanas, lo que conducía a una cura virológica para aproximadamente el 50% de los pacientes en promedio, siendo la tasa de éxito muy inferior en genotipos diferentes al 2 (ver Apartado 1.1.3.). Además, este tratamiento causa efectos secundarios graves como enfermedades autoinmunes, ansiedad o depresión, que constituían la causa más frecuente de interrupción del tratamiento. Éste era un tratamiento inespecífico donde peg-IFN- $\alpha$  provocaba un estado antiviral general en las células y la actividad de la ribavirina se asociaba a varios mecanismos, entre ellos favorecer la respuesta inmune adaptativa de las células T, la inducción de genes estimulados por IFN (ISGs), y la mutagénesis del RNA viral sintetizado entre otros (Pawlotsky et al. 2004) (Scheel & Rice 2013).

Debido a la falta de especificidad, la baja tasa de curación y los graves efectos secundarios de estos tratamientos, fue necesario desarrollar antivirales específicos frente a HCV. Gracias a la generación de modelos sustitutivos de infección en forma de líneas celulares capaces de sostener la replicación (replicones) (Lohmann et al. 1999) (Blight et al. 2002), se han podido desarrollar antivirales de acción directa (DAAs, del inglés *Direct-acting antivirals*) frente a diferentes subunidades de la replicasa de HCV (ver Apartado 1.2.1).

Combinaciones de DAAs han sido llevadas con éxito a la clínica mostrando una tasa de eliminación del virus en más de 95% de pacientes, tras un tratamiento extrahospitalario y oral durante 8-14 semanas de duración (Pawlotsky et al. 2015). Estos tratamientos además mejoran la calidad de vida de los pacientes, reducen la inflamación y mejoran la función hepática en general. Sin embargo, no previenen por completo el desarrollo del cáncer de hígado, lo que sugiere que la erradicación de la infección puede no revertir por completo el daño molecular inducido por el virus durante la infección crónica (Waziry et al. 2017) (Sasaki et al. 2018) (Teng et al. 2019) (Sanduzzi-Zamparelli et al. 2019). Esta hipótesis ha generado gran controversia y se hablará en detalle sobre ella más adelante (ver Apartado 1.1.3.).

### 1.1.1. Epidemiología

HCV pertenece al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae* (Simmonds 2013) Las especies de virus que se clasifican en este género han aumentado en los últimos años (Hartlage et al. 2016). Actualmente se incluyen *Hepacivirus* que tienen como hospedador caballos, roedores, murciélagos, vacas, tiburones, incluso mosquitos (Hartlage et al. 2016;

Williams et al. 2020), siendo los hepacivirus equinos (NPHV) los virus más próximos genéticamente con HCV (Burbelo et al. 2012).

HCV está dividido en 7 genotipos y más de 100 subtipos diferentes. Los distintos genotipos difieren en un 30-35% de nucleótidos por sitio (Messina et al. 2015), lo que otorga a HCV un alto grado de diversidad genética. Además, a nivel epidemiológico en la distribución de los distintos genotipos de HCV existen diferencias geográficas y de vías de transmisión. Algunos subtipos se llaman “subtipos epidémicos”, en concreto los subtipos 1a, 1b, 2a y 3a, porque se distribuyen por todo el mundo, mayoritariamente asociados a transfusiones de sangre contaminada.

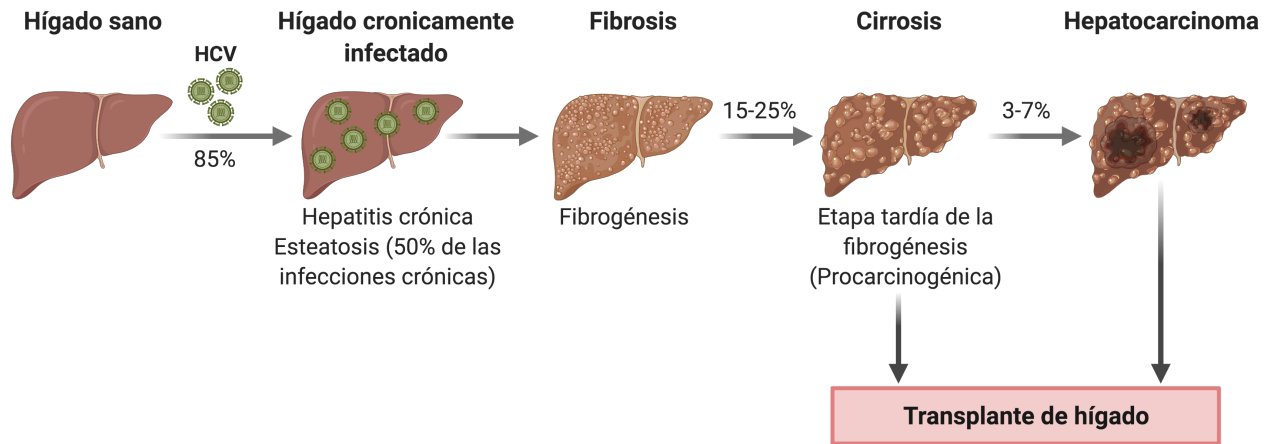
Además de estos “subtipos epidémicos”, existen algunos genotipos que se consideran “endémicos” como el genotipo 4 mayoritario en África Central y Oriente Medio; los genotipos 1 y 2 en África occidental; el genotipo 3 en el sur de Asia y en el Sudeste Asiático es predominante el genotipo 6 (Simmonds 2013) (Messina et al. 2015). Por lo tanto, la distribución geográfica de HCV se relaciona con una circulación endémica ligada a zonas grandes y luego una distribución epidémica, especialmente en los países occidentales, relacionada con los distintas vías de transmisión de la enfermedad. Esta amplia distribución geográfica de HCV ligada a la diversidad genética, junto con el amplio rango de hospedadores de otros *Hepacivirus*, contribuyen a que el origen de HCV continúe sin estar claramente definido (Simmonds 2013) (Pybus & Thézé 2016) (Hartlage et al. 2016).

### 1.1.2. Patogénesis

La patogénesis asociada a la infección crónica por HCV se origina principalmente en la respuesta inmunitaria del hospedador, una respuesta disfuncional, incapaz de eliminar la infección pero que somete a procesos inflamatorios prolongados al órgano infectado (**Figura 1.1**). No obstante, la propia replicación viral a su vez somete al hepatocito infectado a una situación de estrés y reprogramación metabólica prolongada que contribuye de manera necesaria a la patogénesis viral.

Una manifestación clínica de la interferencia de HCV con el metabolismo celular es la esteatosis hepática o hígado graso, que consiste en la acumulación de triglicéridos (TAG) y ésteres de colesterol en el parénquima hepático (Ress & Kaser 2016). La esteatosis hepática se observa hasta en un 50% de los pacientes infectados crónicos (Czaja et al. 1998) y tiene especial prevalencia en los infectados por el genotipo 3 (Rubbia-Brandt et al. 2000). Esta patología favorece la progresión de la fibrosis (Hourigan et al. 1999) y es factor de riesgo para el desarrollo de HCC (Ohata et al. 2003). Además de los estudios realizados en pacientes, en cultivo celular se ha demostrado el incremento causado por HCV de

síntesis de LD (McLauchlan 2009) y en ratones transgénicos HCV induce esteatosis (Moriya et al. 1998; Lerat et al. 2002) y lipogénesis (Lerat et al. 2009).



**Figura 1.1. Desarrollo de las patologías asociadas a la infección por HCV.** Hasta el 85% de las personas infectadas con HCV desarrollaran una infección crónica (World Health Organization). La fibrosis hepática es la respuesta de cicatrización de heridas del hígado a la infección crónica, lo que conduce a un daño inflamatorio, al depósito de matriz extracelular en el parénquima hepático y angiogénesis. La matriz extracelular se acumula muy lentamente, siendo de media 30 años, el tiempo estimado para desarrollar la cirrosis en pacientes con una infección por HCV crónica, en los cuales se ha establecido que presentan un riesgo de entre el 15-25% de desarrollar cirrosis. Una vez que se establece la cirrosis, el potencial para revertir este proceso disminuye (Pellicoro et al. 2014). Actualmente, el trasplante de hígado es la única solución disponible para la insuficiencia hepática o para el de cáncer de hígado, del cual HCV es la principal causa. Creada en BioRender.

No obstante, el mayor determinante de la patogénesis viral es sin duda los fenómenos inmunitarios que acompañan a la infección crónica. La infección conlleva una respuesta inmunológica activa que produce la inducción de interferón (IFN), citoquinas proinflamatorias y, respuestas celulares innatas y adaptativas, pero que resulta ineficaz frente al virus (Heim & Thimme 2014). Esta respuesta da lugar a la primera patología asociada a la infección crónica por HCV, la inflamación del hígado. Sin la eliminación del virus, la infección crónica continua asintomática durante un largo período de años, alterando la arquitectura del hígado, que puede ver comprometida su función a medio-largo plazo.

La inflamación crónica impulsa la fibrogénesis hepática, consecuencia de una reparación tisular exagerada. Este proceso consiste en el depósito progresivo de la matriz extracelular (ECM) en el parénquima hepático y conduce a la formación de tejido conectivo cicatricial

conocido como fibrosis. A medida que se va desarrollando la fibrogénesis, el tejido conectivo cicatricial se puede encontrar en todo el hígado dando lugar a la cirrosis, donde la estructura interna del hígado se destruye por el tejido fibrótico intercalado con nódulos de hepatocitos en regeneración afectando a su funcionamiento. La cirrosis a menudo se desarrolla de manera silenciosa y se vuelve sintomática únicamente en una etapa tardía de su desarrollo, donde es inherentemente procarcinogénica.

Por lo tanto, HCV es el principal factor de riesgo para desarrollar HCC (Degos et al. 2000; Llovet et al. 2016), aunque el desarrollo de HCC causado por HCV presenta características comunes con el cáncer de hígado que surge debido a otras causas, como el alcohol, la infección por HBV y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) (European Association For The Study Of The LiverEuropean Organisation For Research And Treatment Of Cancer 2012) (Goossens & Hoshida 2015). Sin embargo, el desarrollo de HCC rara vez ocurre en ausencia de fibrosis hepática avanzada o cirrosis (Lok et al. 2009) y se estima que el riesgo anual de desarrollo de HCC en estos pacientes es del 3-7% (Llovet et al. 2016).

Existen numerosas revisiones bibliográficas referentes a los procesos que condicionan el desarrollo de HCC como consecuencia de la infección crónica de HCV (Llovet et al. 2016) (Takeda et al. 2017) (Goto et al. 2020). En ellas se trata de explicar la relación entre infección persistente y HCC mediante estudios mecanísticos en modelos de infección en cultivos celulares y en modelos animales. Aunque cada autor incide en diferentes aspectos, todos coinciden en señalar que existe una contribución directa de la alteración de la homeostasis celular por la replicación viral y expresión de proteínas virales al desarrollo de HCC, junto con un ambiente inflamatorio propicio y una vigilancia inmunológica comprometida.

La alteración de la homeostasis celular se produce como consecuencia de la expresión de proteínas virales que conllevan a la inducción de varias rutas de respuesta a estrés (Vasallo & Gastaminza 2015) (Ríos-Ocampo et al. 2019). Estos mecanismos de respuesta a estrés están íntimamente ligados al mantenimiento de la replicación viral de forma sostenida, ya que restringen la capacidad de replicación del virus hasta niveles que permiten la supervivencia celular. De esta manera, se establece una nueva homeostasis de células profundamente modificadas por la infección, pero que no son eliminadas ni por la respuesta inmunitaria ni por mecanismos apoptóticos.

Por lo tanto, la infección crónica por HCV contribuye de manera determinante al desarrollo de HCC. Dado el carácter determinista de estas alteraciones, no queda claro si eliminar el virus es suficiente para eliminar el riesgo de desarrollar HCC. Las nuevas terapias



aprobadas para HCV abren nuevos horizontes, en los que se desconoce la capacidad de los nuevos tratamientos para prevenir el HCC asociado a la infección crónica por HCV (Verna et al. 2020) (Zanetto et al. 2021).

### 1.1.3. Tratamientos frente a la infección crónica por HCV

Desde la identificación de HCV (Choo et al. 1989), el principal objetivo de muchos estudios ha sido el de desarrollar tratamientos antivirales efectivos (Scheel & Rice 2013). El grado de efectividad clínica de las distintas terapias se mide por la respuesta virológica sostenida (SVR; del inglés *sustained virologic response*), que se define como la ausencia de RNA viral en el suero de pacientes crónicos, 24 semanas después del final del tratamiento.

Los primeros tratamientos se basaban en una monoterapia con interferón alfa (IFN- $\alpha$ ). Este tratamiento tenía un éxito reducido, puesto que tras 12 meses bajo tratamiento solo un 16-20% de los pacientes presentaban SVR. Diez años después la cifra de pacientes con SVR aumentó hasta el 35-40% con la adición de ribavirina (RBV) (McHutchison et al. 1998; Pianko & McHutchison 2000). Y fue en 2001, cuando se introdujo en las terapias el uso del IFN- $\alpha$  pegilado (peg-IFN- $\alpha$ ), una modificación química del IFN- $\alpha$  con una vida media más larga, mejor perfil fármaco-cinético que daba lugar a una mayor tasa de SVR (Glue et al. 2000). El peg-IFN- $\alpha$  combinado con RBV era administrado durante 24 o 48 semanas, con una dosis oral diaria de RBV y una inyección semanal de peg-IFN- $\alpha$ , y permitía obtener una SVR del 54-56%. Aunque esta cifra aumentaba en los pacientes infectados con el genotipo 2 y 3, donde hay una SVR de casi el 80% y mucho menor para pacientes de genotipo 1 y 3, altamente prevalentes en países industrializados (Manns et al. 2001; Scheel & Rice 2013).

Se han propuesto varios mecanismos de acción por los que peg-IFN y RBV contribuyen a la SVR. Mientras que peg-IFN- $\alpha$  provoca un estado antiviral general en las células, RBV provocaría mutagénesis del RNA viral recién sintetizado entre muchos otros mecanismos propuestos, no enteramente definidos (Feld & Hoofnagle 2005).

Estos tratamientos eran prolongados en el tiempo y se veían interrumpidos frecuentemente por graves efectos adversos, como enfermedades autoinmunes, anemia hemolítica o síntomas neuropsiquiátricos, que impedían incluso finalizar el tratamiento y, por lo tanto, alcanzar una SVR. Entre los trastornos neuropsiquiátricos graves se encontraban la depresión, los trastornos bipolares, y los pensamientos suicidas (Manns et al. 2006).

En 2011 se aprobó una terapia basada en la combinación de peg-IFN- $\alpha$  y RBV junto con un DAA inhibidor de la proteasa NS3/NS4A, telaprevir o boceprevir para las infecciones por el genotipo 1. Estos tratamientos de combinación triple aumentaron la tasa de curación hasta el 70%, aunque fueron retirados poco después tras verificarse efectos adversos no tolerables (Jacobson et al. 2011) (Poordad et al. 2011).



Las principales dianas para el desarrollo de nuevos antivirales fueron la proteasa NS3/4A, y la polimerasa NS5B. Esta última presenta varios sitios diana: el dominio catalítico para análogos de nucleósidos/nucleótidos y diferentes sitios alostéricos para inhibidores no nucleósidos.

Fue en 2013 cuando se aprobó el sofosbuvir (SOF), el primer DAA frente a la polimerasa viral NS5B. Este compuesto es un análogo de nucleótido que consiguió aumentar la tasa de SVR hasta el 90% en las terapias de combinación con peg-IFN- $\alpha$  y RBV (Rodríguez-Torres et al. 2013). Una de las ventajas del uso de sofosbuvir es que no inhibe las polimerasas de DNA y RNA ni las polimerasas de RNA mitocondriales por lo que sofosbuvir es extremadamente bien tolerado por los pacientes. Además, es altamente efectivo en pacientes con HCV que están coinfectados con HIV (Wyles et al. 2015). Ese mismo año se aprobó otro inhibidor de la proteasa NS3/NS4A, simeprevir, que incrementó la tasa de SVR a valores similares al sofosbuvir (Fried et al. 2013).

La utilización de modelos de replicón (Lohmann et al. 1999) se postuló como la herramienta para desarrollar compuestos excepcionales incluso sin conocer su diana molecular (Bartenschlager 2002). Así, surgieron los inhibidores más potentes frente a HCV, cuya diana molecular es NS5A (Conte et al. 2009; Lemm et al. 2010). Fármacos como daclatasvir/BMS-790052 (Gao et al. 2010) o ledipasvir/GS-5885 (Link et al. 2014), son moléculas extraordinariamente potentes en clínica, pero de mecanismo de acción complejo y no enteramente conocido.

Sin embargo, no fue hasta 2014 cuando se comenzaron a prescribir tratamientos libres de IFN, gracias a la aprobación de sofosbuvir (Sofia et al. 2010). Entre ellos, se aprobó el uso combinado de sofosbuvir con el inhibidor de la proteína NS5A, ledipasvir, para pacientes con genotipo 1, que consiguió como resultado tasas de SVR de hasta el 95% (Afdhal et al. 2014). Actualmente, existen al menos 5 DAAs para la proteasa NS3/4A, 6 DAAs para NS5A y 2 para la polimerasa NS5B, por lo que las investigaciones se centran en definir las terapias de combinación más eficaces. Aquellas que proporcionan las tasas más altas de erradicación del virus, con la duración más reducida del tratamiento y la mínima resistencia.

El tratamiento combinado de daclatasvir (NS5A) y sofosbuvir (NS5B) se presenta como una de las terapias más eficaces (Lange et al. 2014), puesto que es efectivo en clínica hasta en un 99% de los casos (Sulkowski et al. 2014; D. R. Nelson et al. 2015).

La nueva situación generada tras el desarrollo de los DAAs frente a HCV es inédita, dada su enorme eficacia y velocidad con la que la infección es eliminada de los pacientes infectados. A la luz de modelos matemáticos basados en datos obtenidos a partir de la monitorización de los niveles de RNA de pacientes tratados y de los niveles de actividad de

la respuesta inmunitaria inferida a partir de marcadores sustitutivos, se ha postulado que la eliminación del virus en las terapias basadas en DAAs podrían no requerir la eliminación de células previamente infectadas, puesto que la eliminación del virus es rápida y efectiva en claro contraste con la situación que se da en tratamientos basados en IFN, tal y como se detalla en la siguiente sección.

Empleando los datos obtenidos de ensayos clínicos en los que se ha monitorizado tanto el declive de la presencia de RNA viral como la severidad de la inflamación mediante evaluación de los niveles de transaminasa sérica, se han elaborado modelos para interpretar y comparar los mecanismos subyacentes a la eliminación del virus en los tratamientos basados en IFN o en DAAs (Neumann et al. 1998; Feld & Hoofnagle 2005; Perelson & Guedj 2015).

Durante la administración de terapias basadas en IFN, el RNA viral disminuye de manera bifásica. La primera fase durante los primeros días del tratamiento refleja una disminución rápida del RNA de HCV, pero no su completa eliminación sin evidencia de muerte celular, causada por un efecto antiviral directo.

La segunda fase es más lenta, donde la disminución del RNA viral es más paulatina puesto que está ligada a la eliminación de células infectadas por la acción citotóxica de la respuesta inmune adaptativa, que se encuentra parcialmente restaurada tras la reducción de la carga viral por la acción antiviral como inmunomodulador del IFN (Feld & Hoofnagle 2005; Perelson & Guedj 2015). Esta reducción de la carga viral es proporcional a la dosis de IFN administrada y es inversamente proporcional a la tasa estimada de muerte celular (Neumann et al. 1998). Por lo que se observa que la eliminación de las células infectadas, inferida por la elevación de transaminasa sérica, es imprescindible para la curación virológica (Feld & Hoofnagle 2005).

Esta segunda fase depende de la pendiente de la primera fase, puesto que se ha observado que un bloqueo más potente de la producción de virus se asocia con una disminución más pronunciada de la segunda fase (Perelson & Guedj 2015). Esto se observa en la combinación de RBV con peg-IFN- $\alpha$ , donde se acorta la duración del tratamiento (Pawlotsky et al. 2004).

En las terapias basadas en DAAs en combinación con RBV, con o sin peg-IFN- $\alpha$ , también se acelera la disminución de la segunda fase (Zeuzem et al. 2012) y los tratamientos basados en combinaciones de DAAs reducen drásticamente la carga viral hasta niveles indetectables en muy poco tiempo, de una manera tan eficaz, que podría no existir una segunda fase y que algunas células previamente infectadas, podrían volverse antígeno-negativas antes de la restauración de la respuesta inmunitaria (Guedj & Perelson 2011;

Perelson & Guedj 2015). Si no existe una eliminación total de células infectadas, es posible que los pacientes infectados y tratados con DAAs, que se declaran virológicamente curados, porten células previamente infectadas, que, en caso de no ser eliminadas podrían fomentar el desarrollo de patologías hepáticas.

Los mecanismos de acción de la terapia antiviral con IFN reduce el riesgo de HCC en pacientes con infectados y con una enfermedad hepática crónica (Singal et al. 2013). Sin embargo, este efecto debe evaluarse en las nuevas terapias con DAAs libres de IFN (Llovet et al. 2016), puesto que es importante determinar si la erradicación del virus es suficiente para prevenir el HCC y revertir la función hepática dañada en aquellos pacientes con enfermedad hepática ya avanzada. De hecho, existe una gran controversia en el campo sobre el impacto de estos nuevos tratamientos en el desarrollo o reactivación de HCC en pacientes curados (Wirth & Manns 2016; Reig et al. 2016) (Toyoda et al. 2016; Cardoso et al. 2016; Hsu et al. 2019).

## 1.2. El virus de la hepatitis C

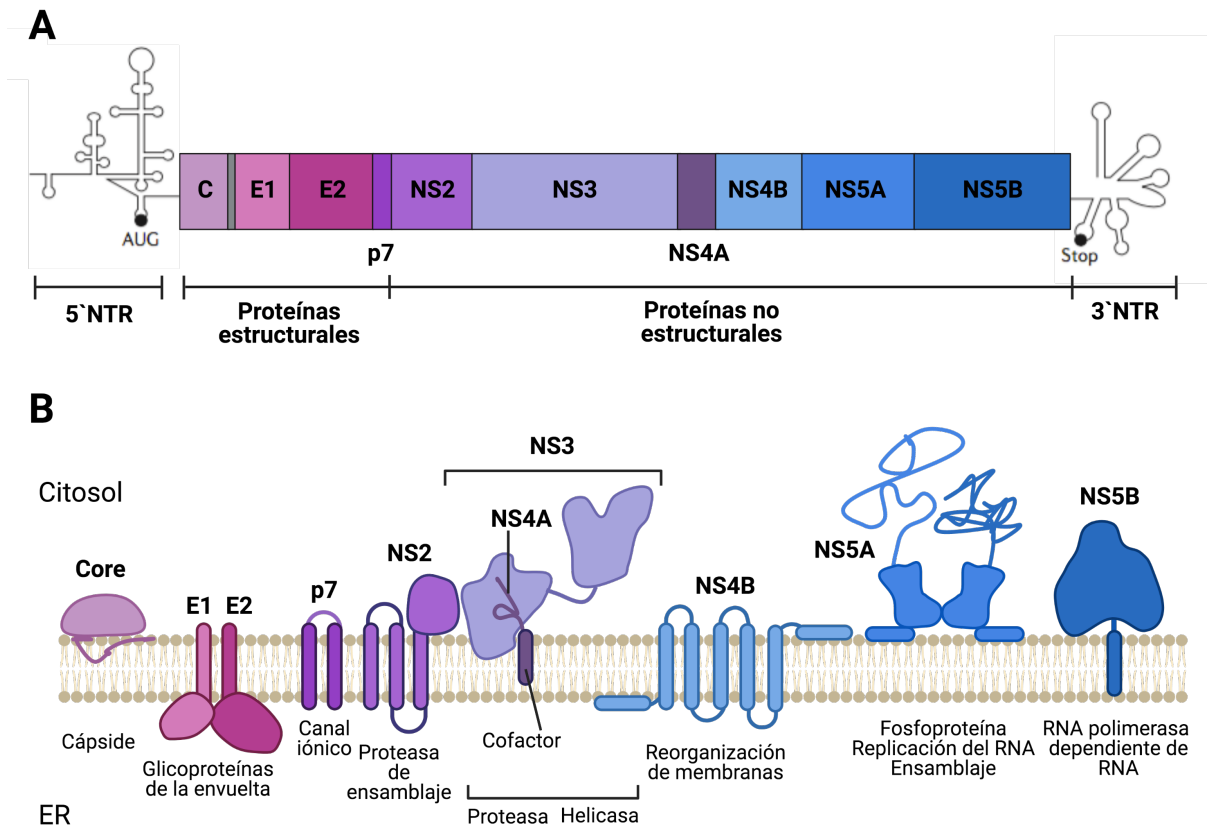
Como se ha mencionado anteriormente el virus de la hepatitis C es el agente etiológico causante de más de 70 millones de infecciones crónicas y de más del 25% de los casos de cirrosis y cáncer de hígado en el mundo. Su descubrimiento por parte de los científicos Dr. Harvey Alter, el Dr. Michael Houghton y el Dr. Charles Rice ha sido galardonado con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2020.

Desde su hallazgo, uno de los principales impedimentos para estudiar en profundidad sus funciones y características fue la imposibilidad, aún vigente, para propagar HCV en cultivo celular. Esta imposibilidad llevó al campo a diseñar e implementar modelos sustitutivos, como los replicones, que han permitido acelerar no solo el proceso de desarrollo de antivirales, sino también conocer detalles moleculares sobre la función de las proteínas virales y su interacción con el hospedador (Moradpour et al. 2007) (Moradpour & Penin 2013). El rescate de virus recombinantes a partir de la cepa JFH-1 (*Japanese Fulminant Hepatitis*) procedente de un paciente japonés con hepatitis fulminante abrió la era de los sistemas de infección para HCV basados en clones moleculares infecciosos. Estos modelos de infección, junto con otros sistemas sustitutivos, como los pseudotipos retrovirales, han permitido completar el estudio de las funciones de las proteínas virales y su interacción con el hospedador en aspectos no recapitulados por los replicones.

### 1.2.1. Organización del genoma y procesamiento de la poliproteína viral.

HCV presenta un genoma de RNA de cadena sencilla y positiva de aproximadamente  $10^4$  nucleótidos. Dicho genoma contiene un único marco abierto de lectura (ORF; del inglés

*open reading frame*) flanqueado por dos regiones altamente estructuradas 5' y 3' no codificantes (UTRs; del inglés *untranslated region*), que son esenciales para la replicación/traducción del RNA viral. La región 5' UTR presenta un sitio de entrada interna del ribosoma (IRES; del inglés *internal ribosome entry site*) que permite la traducción directa del RNA genómico independiente de cap (**Figura 1.2A**).



**Figura 1.2. Estructura del genoma de HCV y topología de las proteínas virales.** A) Esquema del genoma de HCV en el que se representan sus distintas regiones, proteínas estructurales y no estructurales. Se indica además la localización de los codones de iniciación y terminación de la traducción en los extremos 5' y 3' del genoma de HCV. B) Topología de las proteínas virales, su localización en la membrana del retículo endoplásmico y sus funciones principales de las distintas proteínas de HCV. Creada en BioRender.

El ORF codifica una única poliproteína de alrededor de 3000 aminoácidos sometida a procesamiento co- y post-traducciona, dando lugar a diez proteínas diferentes que se pueden clasificar en base a su función en el ciclo de replicación del virus en proteínas del módulo de ensamblaje (Core-NS2) y en proteínas del módulo de replicación (NS3-NS5B) (**Figura 1.2B**). Las proteínas generadas desde la región amino-terminal pertenecientes al módulo de ensamblaje son la proteína de la cápside (Core), las glicoproteínas de la

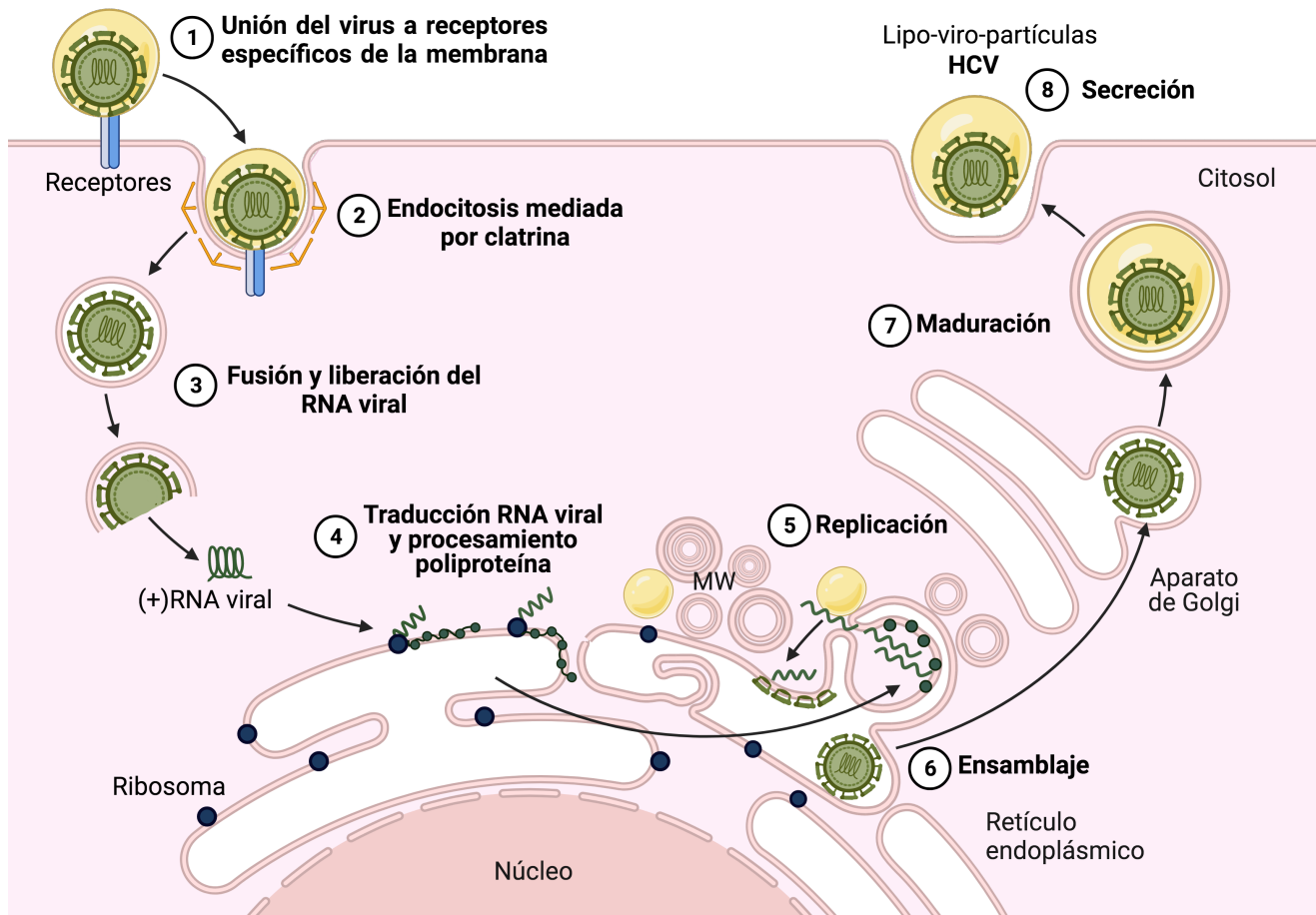
envuelta (E1 y E2), componentes estructurales del virión y las proteínas no estructurales (NS) que facilitan el ensamblaje de las partículas virales (p7 y NS2) (Scheel & Rice 2013). Por otro lado, las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B son necesarias y suficientes para la replicación del RNA viral (**Figura 1.2B**).

### 1.2.2. Ciclo replicativo de HCV

Los viriones de HCV tienen un diámetro de 65-70 nm y presentan una envuelta de heterodímeros de las glicoproteínas E1 y E2, que recubren una cápside viral irregular compuesta por Core, y dentro de la cual se sitúa el genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Los viriones de HCV tienen una densidad característicamente baja y heterogénea (1.003-1.15 g/ml), debido a su asociación con lipoproteínas de baja densidad y muy baja densidad (LDL y VLDL, respectivamente; del inglés *very-low density lipoprotein*). Por lo tanto, HCV circula como lipoviropartículas (LVPs) (Andre et al. 2002) de composición lipídica semejante a las VLDL (Merz et al. 2011). Esta asociación con lipoproteínas del hospedador facilita su entrada en la célula diana a la vez que protege a las partículas de anticuerpos neutralizantes (revisado en (Bartenschlager et al. 2011)).

El ciclo replicativo de HCV es citoplasmático (**Figura 1.3**). La entrada del virus en la célula se produce por endocitosis (Blanchard et al. 2006), tras lo cual el genoma se desencapsida y se libera al citosol (Ploss & Evans 2012; Douam et al. 2015). El RNA genómico de cadena positiva entrante sirve como molde para la traducción primaria, un proceso dependiente del IRES presente en el 5'UTR de HCV. La síntesis de la poliproteína ocurre en el retículo endoplásmico (ER; del inglés *Endoplasmic reticulum*), donde se procesa co-traduccionalmente por peptidasas-señal asociadas al ER y posteriormente procesadas mediante las proteasas virales (NS2-NS3 y NS3/4A), ésta última, diana terapéutica de los tratamientos por DAAs (Moradpour & Penin 2013) (**Figura 1.2A**). Tras la traducción de las proteínas virales, las proteínas del modulo de replicación (NS3-NS5B) reclutan el genoma viral e inducen, la formación de los complejos de replicación, dentro de compartimentos membranosos derivados principalmente del ER en forma de vesículas de doble membrana (DMVs; del inglés *double-membrane vesicles*) (Romero-Brey et al. 2012) (Romero-Brey et al. 2015). En este sentido, los DAAs dirigidos frente a NS5A, como daclatasvir o ledipasvir interfieren con la formación de las vesículas de doble membrana en sistemas independientes de replicación (C. Berger et al. 2014), lo que sugiere un papel fundamental de NS5A en la formación de estas estructuras.

En estos complejos, la proteína NS5B, con actividad polimerasa de RNA dependiente de RNA, replica el genoma viral *de novo* mediante la producción de intermediario de RNA de cadena negativa, que es usado como molde para la generar a su vez RNA genómico de cadena positiva. NS5B es la diana molecular para diversos tipos de DAAs, incluido SOF (Sofia et al. 2010).



**Figura 1.3. Representación gráfica del ciclo replicativo de HCV.** (1) La partícula viral asociada a lipoproteínas (lipo-viro-partícula) es reconocida por receptores de superficie y (2) es internalizada mediante endocitosis mediada por clatrina. (3) La fusión de la envuelta del virus con la membrana del endosoma permite la desencapsidación y liberación del genoma. (4) El RNA viral es traducido en la membrana del ER y la poliproteína es procesada por proteasas virales y de la célula hospedadora produciendo las proteínas individuales. (5) Las proteínas del módulo de replicación en asociación con factores celulares forman estructuras de membrana (MW) junto con gotas de lípidos citosólicos donde ocurre la replicación del genoma viral. (6) Los genomas progenie son encapsulados con la proteína Core, e incorporados a vesículas nacientes que contienen las glicoproteínas de la envuelta. (7) El virión madura durante su paso por la vía secretora, se asocia a lipoproteína y (8) es secretado. Creada en BioRender.

El genoma sintetizado se encapsida para formar partículas virales o sirve como molde para la traducción secundaria (Moradpour & Penin 2013). El ensamblaje de viriones progenie es un proceso complejo y coordinado con la replicación. Una vez procesada en el ER, Core se asocia con gotas lipídicas citoplasmáticas (LDs, del inglés *lipid droplets*), interaccionando con NS5A (Miyinari et al. 2007) y el resto de las proteínas virales involucradas en la organización de las plataformas de ensamblaje, como p7 y NS2 (Jones et al. 2007; Jirasko et al. 2010). Estas plataformas están formadas por membranas procedentes del ER que envuelven a LDs cubiertas por Core y NS5A y están próximas a los complejos de replicación, lo que permite la coordinación espacial entre la replicación del genoma viral y el ensamblaje de los viriones (H. Wang & Tai 2016; J.-Y. Lee et al. 2019).

Las partículas virales se forman por agregación de la nucleocápside con el genoma progenie, adquiriendo la envuelta membranosa por gemación de la nucleocápside hacia el lumen del ER próximo a las zonas de ensamblaje donde se encuentran insertadas las glicoproteínas E1/E2 (Bartenschlager et al. 2011).

Inicialmente, los viriones se ensamblan como precursores infecciosos intracelulares de alta densidad (Gastaminza et al. 2006), que siguen un proceso de maduración adquiriendo su característica baja densidad y son posteriormente secretados al medio, a través de la red vesicular *trans* Golgi/endosomal, diferente a la empleada por las VLDL con las que parecen asociarse extracelularmente (Benedicto et al. 2015; Mankouri et al. 2016; Takacs et al. 2017; Denolly et al. 2019) (**Figura 1.3**).

### 1.2.3. Impacto de la replicación de HCV sobre la célula hospedadora

El ciclo replicativo de HCV produce profundos cambios en la célula tanto a nivel estructural como funcional, puesto que depende de las membranas intracelulares para formar las plataformas de replicación del RNA viral y ensamblaje de viriones en forma de red membranosa, una estructura característica de células infectadas por HCV (Romero-Brey et al. 2012; Mingorance et al. 2018; J.-Y. Lee et al. 2019). Por lo tanto, HCV interfiere con el metabolismo de lípidos prácticamente en cada uno de los aspectos principales de su ciclo replicativo, como se detallará a continuación.

Los mecanismos de entrada de los viriones en los hepatocitos requieren de la interacción con receptores de la membrana plasmática. La primera interacción con los hepatocitos se produce a través de glicosoaminoglicanos (GAGs), los proteoglicanos de heparán sulfato y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) que permiten la adsorción de las partículas a la superficie de la célula. En la membrana plasmática, existen al menos cinco receptores esenciales para la entrada del virus, los cuales reconocen tanto factores virales como celulares asociados a los viriones y determinan, en parte, el tropismo hepático que

presenta el virus: SR-B1, CD81, NPC1L1, claudin 1 (CLDN1) y occludin (OCLN) (Ploss & Evans 2012). Después la fusión de la membrana viral y celular tiene lugar en endosomas tempranos mediada por E1/E2 de manera dependiente de pH (Dubuisson et al. 2008), tras lo cual el genoma se libera y comienza a traducirse, primero en el citosol y después en el ER.

A continuación, las proteínas de la replicasa viral (NS3-NS5B) insertadas en la membrana del ER inducen la formación de los complejos de replicación, compartimentos membranosos derivados principalmente del ER en forma de vesículas de doble o múltiples membranas (DMVs/MMVs) que en conjunto forman la red membranosa (MW; del inglés *membranous web*) (Romero-Brey et al. 2012) (Pérez-Berná et al. 2016). Estas membranas tienen una composición lipídica distinta, rica en colesterol, y, contienen marcadores de endosomas tempranos y tardíos, vesículas de transporte COP, mitocondrias y LDs (Romero-Brey et al. 2012; Paul & Bartenschlager 2015b).

Entre los factores celulares esenciales para la formación de DMVs, destaca la quinasa de lípidos fosfatidilinositol 4-quinasa III alfa (PI4K-III $\alpha$ ) que interacciona con NS5A y aumenta los niveles de su sustrato, el fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP4) (K. L. Berger et al. 2009; K. L. Berger et al. 2011; Reiss et al. 2011). PI4P participa en la formación de la curvatura de membrana (Hammond et al. 2012; Rahajeng et al. 2019) y podría facilitar la formación de DMVs (Popescu et al. 2014; Meyers et al. 2016). Además, PIP4 recluta los factores celulares FAPP2 (proteína 2 adaptadora de 4-fosfato) y OSBP (proteína de unión a oxysterol) esenciales para la replicación de HCV (Amako et al. 2009) (Khan et al. 2014) (H. Wang et al. 2014). Además de estos factores, en nuestro laboratorio se han descrito tres factores celulares implicados en la remodelación de lípidos de membranas, que son limitantes para producción de progenie viral. El receptor sigma-1 (Friesland et al. 2013) y lipin1 (Mingorance et al. 2018) están implicados en la generación de los complejos de replicación funcionales de HCV. Mientras que lipin2, a pesar de cooperar con lipin1 para mantener la homeostasis de glicerolípidos en el hígado, interfiere con la secreción de viriones de HCV en las últimas etapas de la infección (Castro, Calvo, et al. 2019),.

El ensamblaje de viriones infecciosos está estrechamente relacionado con los componentes de síntesis de lipoproteínas y fuertemente unido a LDs (Miyanari et al. 2007; J.-Y. Lee et al. 2019), unos orgánulos donde se almacenan lípidos neutros que ven incrementado su número durante la infección por HCV (Moriya et al. 1997) (Miyanari et al. 2007). Las LDs se localizan cerca de los complejos de replicación y a las que se asocia la proteína Core y NS5A (Menzel et al. 2012). En el traslado de Core a LDs es necesaria la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT1), una enzima implicada en la formación de triglicéridos (TAG) a



partir de diacilglicerol (DAG) y que interacciona físicamente con la proteína viral Core (Herker et al. 2010).

Los compartimentos de replicación y ensamblaje, derivan de una profunda reorganización de diferentes orgánulos celulares (Meyers et al. 2016), generándose distintos tipos de estrés, incluyendo respuestas a estrés de ER, debido a la sobrecarga por sobreexpresión de proteínas virales y alteraciones en la composición de lípidos de membrana, y a estrés oxidativo debido a la disfunción mitocondrial sostenida inducida por la expresión de proteínas virales (Vasallo & Gastaminza 2015) (Pérez-Berná et al. 2016; Ríos-Ocampo et al. 2019). Esta situación de estrés sostenido, lejos de producir la muerte celular, permite la adaptación y persistencia del virus gracias a mecanismos de autorregulación de los niveles de replicación viral. Así, la producción de radicales libres por parte de mitocondrias disfuncionales puede desencadenar la peroxidación de lípidos (LPO), alterando la estructura de membranas celulares, lo que contribuye al deterioro de funciones celulares y también conlleva una reducción en la replicación viral. Éste y otros mecanismos de retroalimentación contribuyen a la modulación de los niveles de replicación y el consiguiente estrés celular para asegurar la persistencia de la infección crónica en células funcionalmente alteradas, pero viables (Huang et al. 2007; Yamane et al. 2014) (Paul & Bartenschlager 2015a; Vasallo & Gastaminza 2015; Ríos-Ocampo et al. 2019).

La persistencia de la infección junto con la dependencia del ciclo replicativo por el metabolismo de lípidos y lipoproteínas (Herker & Ott 2011; Neufeldt et al. 2018) (Z. Zhang et al. 2019) sugiere que la interferencia de HCV con la homeostasis de los lípidos podría contribuir a la patogénesis de algunas de las manifestaciones clínicas de la infección, entre las que destaca la acumulación anormal de lípidos neutros en el hígado (esteatosis hepática), que afecta al 50% de los pacientes crónicos de HCV (Czaja et al. 1998).

Las proteínas del HCV promueven la esteatosis aumentando la lipogénesis y la absorción de ácidos grasos, y disminuyendo la oxidación de ácidos grasos y la secreción de lipoproteínas (Lerat et al. 2009). Como hemos visto anteriormente, Core interactúa con PPAR- $\alpha$ , que es esencial para el desarrollo de esteatosis hepática y HCC (Tanaka, Moriya, Kiyosawa, Koike, Gonzalez, et al. 2008). Por lo tanto, la proteína Core destaca como un importante determinante viral en la modulación del metabolismo de los ácidos grasos y la acumulación de TAG en el hígado de una forma dependiente de la ruta Sirt1 (Moriya et al. 1998; C. Zhang et al. 2017). Sin embargo, también otras proteínas virales como NS2 y NS4B en cultivo celular son capaces de inducir la acumulación de LDs (Oem et al. 2008) por lo que es probable que múltiples proteínas del HCV contribuyan a desarrollar esteatosis hepática en pacientes crónicos de HCV.

Estas alteraciones asociadas a la replicación del virus y los mecanismos moleculares anteriormente mencionados que pueden favorecer el desarrollo de HCC indican el profundo impacto que genera la infección por HCV en la célula hospedadora. Esta consideración junto con el hecho de que los modelos matemáticos basados en datos obtenidos en pacientes tratados con terapias de combinación de varios DAAs sugieren una rápida erradicación del virus (Perelson & Guedj 2015), se podría reducir la probabilidad de que una célula persistentemente infectada sea detectada y eliminada por células T citotóxicas, al dejar de expresar antígeno viral rápidamente y no contar el tratamiento con los efectos inmunomoduladores del IFN. Por tanto, es posible que la eliminación de HCV mediada por tratamiento con DAAs no precise de la eliminación de células previamente infectadas. Esta noción se sostiene también por modelos matemáticos que estudian la cinética de propagación de variantes resistentes al tratamiento, que sostienen que la eliminación de las células infectadas no es imprescindible para la erradicación de HCV en pacientes infectados (Ke et al. 2018).

Por lo tanto, podría ocurrir que células virológicamente curadas en las que se ha erradicado la infección por HCV, se encuentren reprogramadas por la infección persistente de manera potencialmente irreversible. Esta Tesis Doctoral versa sobre la identificación de alteraciones causadas por la infección persistente por HCV en la célula hospedadora que no desaparezcan tras la eliminación del virus en cultivo celular.

## 2. OBJETIVOS

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es **determinar si existen alteraciones en la homeostasis celular por la infección persistente por HCV que no sean reversibles tras la eliminación de la infección mediante tratamiento farmacológico**. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollar modelos de infección persistente en cultivo celular para evaluar la eficacia de los DAAs para erradicar la infección por HCV
2. Identificar alteraciones transcriptómicas celulares durante la infección persistente y tras la eliminación del virus con DAAs, estudiando los distintos perfiles de expresión génica como medida de evaluación de alteraciones permanentes sobre la homeostasis celular
3. Analizar la posible relevancia clínica de las alteraciones observadas en los modelos en cultivo celular

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cultivo de líneas celulares

En este trabajo se han empleado únicamente células Huh-7, línea celular que deriva de hepatoma humano (Sainz & Chisari 2006) (Nakabayashi et al. 1982) cedida por el Dr. Francis V. Chisari (TSRI, California, EEUU). En esta memoria se empleará el término Huh7<sub>pro</sub> para referirse a esta línea celular. Se empleará el término Huh7<sub>DMSO</sub> para las mismas células sometidas a arresto del ciclo celular, tal y como se describe en la sección 3.4.2 y en (Sainz & Chisari 2006).

Las células Huh-7 se cultivaron en DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Gibco, 31600-091) suplementado con 10 mM (1M =100X) HEPES, aminoácidos no esenciales al 1% v/v (Sigma-Aldrich, M7145), 100 U/ml penicilina-estreptomicina (Gibco, ThermoFisher Scientific, 15140122) y 10% v/v suero fetal bovino (LINUS) inactivado por calor (30 min 56°C), referido en adelante como medio completo. Se incubaron a 37° C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Además, mediante PCR se confirmó la ausencia de contaminación con *Mycoplasma sp.* en todas las líneas celulares en cultivo.

#### 3.2. Virus

Los virus de la hepatitis C aislados de pacientes no son infecciosos en modelos estándar de cultivo celular. No obstante, existe la posibilidad de producir virus infecciosos en Huh-7 a partir de genomas virales completos clonados a partir de secuencias aisladas de pacientes y modificados genéticamente. A continuación, se hablará de los virus utilizados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

##### 3.2.1. Virus de la hepatitis C en cultivo celular

**Virus de la hepatitis C cepa JFH-1:** virus recombinante adaptado a cultivo celular que procede de un aislado de genotipo 2a obtenido de un paciente japonés con hepatitis fulminante (Kato et al. 2001) (Wakita et al. 2005) (Zhong et al. 2005). Este virus es una herramienta útil en ensayos de infección a baja multiplicidad y en el establecimiento de infecciones persistentes durante meses sin producir efecto citopático (Castro, Ávila-Pérez, et al. 2019). Cedido por Takaji Wakita (Universidad de Tokyo).

**Virus de la hepatitis C cepa D183:** virus adaptado a cultivo celular que se obtuvo mediante pases seriados del virus JFH-1 en las células Huh7.5.1 (Zhong et al. 2006). Presenta una elevada capacidad para replicar en Huh-7, mostrando una cinética de expansión más rápida y con títulos extracelulares superiores a los de la cepa parental, lo que permite realizar infecciones a alta multiplicidad de infección (MOI 10). Cedido por Jin Zhong (Instituto Pasteur, Shanghai).

### 3.2.2. Producción de stocks de virus

Todos los ensayos de infección con el virus de la hepatitis C se realizaron en un laboratorio dentro de las instalaciones de nivel 3 de contención biológica del Centro Nacional de Biotecnología.

#### 3.2.2.1. Producción de virus infecciosos a partir de cDNA

Para la producción del virus recombinante infeccioso JFH-1, el genoma viral se produjo por transcripción *in vitro* del cDNA y se electroporó en células Huh-7.5.1 clon-2. El plásmido empleado como molde para la transcripción *in vitro* del cDNA (pJFH1) fue digerido durante 16 horas con 4 U/μg de la enzima de restricción XbaI (*Roche*). Para la posterior purificación del plásmido, se trató con una mezcla de proteinasa K (100 μg/ml) en buffer TNE 1x (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) al 0.5% SDS durante 1 hora a 50°C. A continuación, se llevaron a cabo dos rondas de extracción de DNA. El plásmido purificado (pJFH1) se cuantificó y se conservó -20°C.

El molde linearizado y purificado se empleó para una reacción de transcripción *in vitro* empleando el kit comercial Megascript T7 (*Ambion, Paisley, UK*). El producto obtenido se digirió con DNasa, se precipitó con cloruro de litio (7.5 M cloruro de litio en 50 mM EDTA), se lavó con etanol al 75% y luego al 100%. Finalmente, se resuspendió el RNA obtenido transcrito *in vitro* (IVT) en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Zhong et al. 2005).

Este RNA transcrito *in vitro* (IVT) se empleó para electroporar en células Huh-7.5.1 clon-2. Para ello, las células se levantaron con una solución al 0.5% de tripsina/EDTA, se resuspendieron en medio completo hasta obtener una suspensión celular homogénea y se lavaron con PBS. Las células se resuspendieron en Cytomix (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.6, 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, pH 7.6) suplementado con 5 mM glutatión a una concentración de 1x10<sup>7</sup> células/ml. A continuación, se mezclaron 10μg de RNA IVT en 0.4 ml de la suspensión celular anterior. La mezcla resultante se transfirió a una cubeta de electroporación de 4 mm (*Biorad*) y se conservó en hielo hasta someterla a un pulso de 0.27 kV, 100 Ohms y 960 μF en un sistema Gene Pulser de *Bio-Rad*. Inmediatamente después del pulso, las células se mantuvieron a 4°C durante 10 min. Después se sembraron en una botella T75 de tapón con filtro (*Corning*) con 15 ml de medio completo. En este punto, los cultivos celulares se llevaron a un laboratorio de nivel 3 de contención biológica.

A distintos tiempos post- electroporación (días 3, 6 y 9), se recogieron sobrenadantes que se conservaron alicuoteados a -80°C y se repuso el medio completo de cultivo hasta el siguiente punto de recogida. Para determinar la eficiencia de la electroporación se midió la infectividad del sobrenadante (Apartado 3.4.4.).

### 3.2.2.2. Producción de stocks de virus por propagación de virus infeccioso

Para la producción de stocks de virus (JFH-1 y D183), los sobrenadantes infecciosos generados por electroporación se diluyeron en medio completo para infectar a MOI de 0.01 células Huh-7.5.1 clon-2 sembradas a una densidad de  $4.5 \times 10^6$  células en una botella T162 de tapón con filtro (Corning). Durante los días de máxima producción viral (días 6-9 para JFH-1 y días 3-6 para D183), los sobrenadantes se recogieron diariamente y se centrifugaron durante 5 min a 4000 rpm para eliminar posibles restos celulares. Estos se titularon mediante dilución límite por inmunofluorescencia (Apartado 3.4.4.) y se conservaron en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. Fármacos

**Sofosbuvir (PSI-7977):** antiviral de acción directa frente a la polimerasa viral NS5B de HCV (Sofia et al. 2010). Compuesto comercial de Selleckchem, disuelto en DMSO (Sigma-Aldrich) a una concentración inicial de 10 mM.

**Daclatasvir (BMS-790052):** antiviral de acción directa frente a HCV, cuya diana molecular es NS5A (Gao et al. 2010). Compuesto comercial de Selleckchem, disuelto en DMSO (Sigma-Aldrich) a una concentración inicial de 10 mM.

### 3.4. Infecciones virales

#### 3.4.1. Infección persistente en células proliferativas

Las células Huh7<sub>pro</sub> se sembraron con una confluencia de  $4 \times 10^5$  células en botellas de cultivo con tapón de filtro ( $25\text{cm}^2$ ). Al día siguiente, se inocularon a una multiplicidad de infección baja (MOI 0.01) con la cepa JFH-1 (genotipo 2a) de HCV. Dos días post-infección se amplificaron los cultivos a una superficie mayor, siempre en botellas con tapón de filtro ( $75\text{cm}^2$ ). Los cultivos celulares se mantuvieron sub-confluentes durante 4 semanas, pasando las células dos veces por semana en las condiciones estándar establecidas (Castro, Ávila-Pérez, et al. 2019). A la multiplicidad empleada, la cepa JFH-1 se propaga a toda la población de células infectadas en 8-10 días (Zhong et al. 2005), estableciendo una infección persistente que se puede mantener de manera indefinida (Zhong et al. 2006). Para ello, se procesaron las muestras mediante microscopía de inmunofluorescencia frente a la proteína E2 de HCV (ver Apartado 3.5.3.).

Tras verificar que la mayor parte de la población presenta tinción positiva frente a la proteína E2 de HCV, las células infectadas de forma persistente y las control se dividieron para tratar con una combinación de dos fármacos antivirales de acción directa (DAAs). Así se mantuvieron en paralelo dos poblaciones de células infectadas y otras dos control, tratadas y sin tratar. Se fijó la concentración de sofosbuvir (SOF;  $1\mu\text{M}$ ) y daclatasvir (DCV;

10nM) y se incubaron las células bajo tratamiento durante 3 semanas, pasando las células dos veces por semana en las condiciones correspondientes con o sin tratamiento. Tras este periodo de tratamiento, se pasaron las células durante otras 3 semanas sustituyendo el medio completo suplementado con DAAs por medio sin tratamiento, para monitorizar la posible reactivación de la replicación de RNA remanente. Se recogieron semanalmente muestras de los sobrenadantes para controlar la producción del virus de la progenie así como de extractos celulares para poder medir el RNA viral.

#### 3.4.2. Infección persistente en células quiescentes

Las Huh7<sub>DMSO</sub> se generaron sembrando células Huh7<sub>pro</sub> en placas multipocillo M12 pre-tratadas con colágeno de tendón de cola de rata (Corning)(30-40 mg/ml) en PBS completo durante 1 hora a 37°C y suplementando el medio completo con 2% DMSO (*Sigma-Aldrich*) a lo largo de los experimentos con este sistema, cambiando el medio mínimo dos veces por semana. Tras retirar el colágeno y lavar con PBS completo, las células Huh7<sub>pro</sub> se sembraron con una confluencia de  $3 \times 10^4$  células por pocillo en placas multipocillo de 12 pocillos (M12, *Corning*). Al día siguiente, se sustituyó el medio de cultivo por medio completo suplementado con 2%DMSO

Estas células no se dividen, por lo que es necesario sembrar los triplicados de cada condición y para cada tiempo al que se quieran recoger extractos celulares, así como para fijar con cristales para inmunofluorescencia.

Tras de dos semanas en presencia de 2%DMSO, tiempo estipulado para la re-diferenciación y la recuperación de la susceptibilidad a la infección por HCV (Sainz & Chisari 2006), los cultivos quiescentes fueron inoculados con un stock viral preparado en medio completo sin DMSO a alta multiplicidad de infección (MOI 10) con la cepa D183 (genotipo 2a) de HCV y 5 horas después se retiró el inóculo, se lavaron con PBS y las células se pusieron de nuevo con medio completo con el 2%DMSO. Los cultivos celulares se mantuvieron infectados durante 2 semanas, cambiando el medio completo con 2%DMSO dos veces por semana. A la multiplicidad empleada, el virus infecta toda las células de manera simultánea, obteniendo títulos extracelulares constantes a partir de las 72 horas post-infección se comprobó mediante inmunofluorescencia que la mayor parte de la población presentaba tinción positiva frente a la proteína E2 de HCV, estableciendo una infección persistente que se puede mantener de manera limitada, que no se puede prorrogar más allá de las 6-7 semanas post infección (Sainz & Chisari 2006). Tras dos semanas de infección, las células infectadas y las control se trataron con la combinación de SOF (1µM) y DCV (10nM) durante a 2 semanas. Tras este periodo de tratamiento, se sustituyó el medio de cultivo por medio sin tratamiento, para monitorizar la posible

reactivación de la replicación de RNA remanente durante otras 2 semanas adicionales. En total, a tiempo final del experimento las células habían estado 55 días en presencia del 2%DMSO. Se recogieron periódicamente muestras de los sobrenadantes para controlar la producción del virus de la progenie, y debida a la limitación de muestras se recogieron extractos de las células antes y después del tratamiento con DAAs, así como al final del experimento.

### 3.4.3. Infección de ciclo único

Para llevar a cabo una infección de ciclo único se sembraron en  $5 \times 10^4$  células Huh7<sub>pro</sub> por pocillo en placas multipocillo de 12 pocillos (M12, *Corning*). Al día siguiente la mitad de la placa se inoculó a alta multiplicidad de infección (MOI 10) con la cepa D183 (genotipo 2a) de HCV y tras 5 horas de incubación se retiró el inóculo, se lavaron con PBS y las células pusieron de nuevo con medio completo. A las 48 horas post-infección se amplificaron para a día 3 post-infección recoger en triplicado biológico extractos celulares (NT<sub>D3</sub>) y poder comenzar el tratamiento con SOF (1 $\mu$ M) y DCV (10nM). Tres días después se recogieron muestras de células infectadas y mock tratadas (TR<sub>D6</sub>) y sin tratar (NT<sub>D6</sub>). Se recogieron además periódicamente muestras de los sobrenadantes para controlar la producción del virus de la progenie.

### 3.4.4. Determinación del título de infectividad extracelular mediante recuento de focos por inmunofluorescencia

La titulación de los stocks de HCV (Apartado 3.2.2.) y sobrenadantes recogidos en las distintas infecciones viral se llevó a cabo mediante dilución límite y análisis de formación de focos de infección por inmunofluorescencia. Cada foco de infección se considera una única partícula infecciosa, también definida como unidad formadora de focos (FFU; del inglés *fluorescent focus units*).

Para determinar la infectividad extracelular de una muestra, se sembraron células  $1 \times 10^4$  células Huh7<sub>pro</sub> por pocillo en placas multipocillo de 96 pocillos (M96, *Corning*), en triplicado para cada muestra. Al día siguiente se prepararon diluciones seriadas (1:5) de las muestras infecciosas en medio completo y las células se inocularon con 100 $\mu$ l de cada dilución. A las 72 horas post-infección las células se fijaron durante 20 min con una solución de formaldehído (FA) al 4% en PBS y se lavaron dos veces con PBS.

Después se realizó un ensayo de inmunofluorescencia frente a la proteína viral E2 (Apartado 3.5.3.) directamente sobre la placa multipocillo M96. Las muestras se analizaron mediante recuento del número de focos de infección en un microscopio de fluorescencia. Únicamente se contabilizaron aquellas diluciones en las que los focos de infección se



distinguían como unidades discretas hasta llegar a la dilución que resulta negativa para la formación de dichos focos (dilución límite). El título de infectividad extracelular (FFU/ml) de cada muestra se calculó multiplicando el número de focos de infección de cada pocillo por su correspondiente factor de dilución, y multiplicando dicho valor por 10 para obtener el número de focos por ml. Entre los triplicados biológicos se promedió la media y desviación típica.

### 3.5. Detección de proteínas

#### 3.5.1. Anticuerpos

**Anti-E2 (AR3A)** Anticuerpo primario monoclonal de humano frente a la glicoproteína E2 de HCV genotipo 2a (Dr. Mansun Law, *The Scripps Research Institute*) (Law et al. 2008). Se empleó para detectar E2 en inmunofluorescencia (Apartado 3.5.3) a una dilución 1:1000.

**Anti-humano IgG de cabra conjugado con Alexa 488** (*Thermo Fisher Scientific*, Ref. A11013). Se empleó como anticuerpo secundario policlonal para detectar la glicoproteína viral E2 en inmunofluorescencia (Apartado 3.5.3) a una dilución 1:500.

#### 3.5.2. Inmunofluorescencia

Para ello, las células, previamente fijadas durante 20 min con 4%FA y lavadas dos veces con PBS, se permeabilizaron durante 1 hora con “Binding buffer” (3% BSA, 0.3% de Tritón X-100 diluidos en PBS). A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario anti-E2 AR3A (dilución 1µg/ml) en “Binding buffer” durante 1 hora. Tras dos lavados con PBS, las células se incubaron en “Binding buffer” con el anticuerpo secundario anti-humano IgG de cabra conjugado al fluoróforo Alexa 488 (dilución 1:500) junto el reactivo 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (dilución 1:1000) para teñir los núcleos celulares. Las células se lavaron de nuevo dos veces con PBS y se mantuvieron en PBS a 4°C hasta ser analizadas en el microscopía de fluorescencia.

Las células sembradas sobre cubreobjetos de vidrio, en el último lavado de PBS se montaron sobre un portaobjetos de vidrio con Prolong (Invitrogen-Carlsbad, CA). Estas muestras se analizaron mediante microscopía confocal, a través de un equipo Leica TCS SP5 laser scanning system (Leica Microsystems). Se tomaron imágenes de 1024×1024 píxeles a una profundidad de escala de grises de ocho bits. Se adquirieron imágenes secuencialmente cada 0.13–0.3 µm a través de una lente de aceite de inmersión 63x/ 1.40 N.A, empleando el software LAS AF v 2.6.0 (Leica Microsystems). El análisis de imagen se realizó utilizando el programa Image J.

### 3.6. Análisis de RNA

#### 3.6.1 Extracción de RNA total y tratamiento de RNA con DNasa para la eliminación de DNA contaminante

Para la extracción de RNA total se empleó GTC (isotiocianato de guanidinio) (Chomczynski & Sacchi 1987). Las muestras de RNA se trataron adicionalmente con DNasa I Turbo DNA-free (Life Technologies, AM1907) para eliminar el DNA contaminante que podría afectar el resultado de la cuantificación, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes para muestras con alto contenido de DNA. Tras el tratamiento enzimático, las muestras volvieron a ser extraídas con el método GTC. Todas las muestras extraídas se conservaron a -80°C hasta su análisis.

#### 3.6.2 Cuantificación de mRNA y RNA viral mediante RT-qPCR

Las preparaciones de RNA (20-500 ng/ul) obtenidas en el apartado anterior (Apartado 3.5.1) se sometieron a una RT-qPCR, primero con una reacción de transcripción inversa con hexámeros aleatorios empleando el kit comercial Taqman Reverse Transcription Reagents (*Applied Biosystems*, N8080234) y posteriormente con una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR; del inglés *quantitative polymerase chain reaction*) empleando la mezcla de Power SYBR Green (*Applied Biosystems*, 436759) y en un equipo de PCR a tiempo real 7500 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Se emplearon los pares de oligonucleótidos disponibles comercialmente (*Sigma-Aldrich*) se usaron para la cuantificación relativa del mRNA de los transcritos celulares descritos. Para el RNA viral se utilizó la curva estándar generada por dilución en serie de un número de copias conocido del amplicón correspondiente clonado en un vector plasmídico pGEM-T (*Promega*, A3600).

### 3.7. Secuenciación masiva de RNA total (RNA-seq)

#### 3.7.1. Secuenciación, alineamiento y lecturas

La secuenciación masiva de RNA (NGS, del inglés *next generation sequencing*) se realizó en el Servicio de Genómica del Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona) empleando la plataforma Illumina. El RNA total (10µg; Apartado 3.6.1) se sometió a una cromatografía de afinidad para la eliminación de RNA ribosómico usando RibozeroTM (*Illumina*) antes de la preparación de las librerías de cDNA. Para la preparación de dichas librerías se utilizó kit comercial TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit (*Illumina*, RS-122-2201). Antes de secuenciar, se comprobó la calidad de las muestras resultantes

cualitativamente en el 2100 Bioanalyzer (Agilent). La secuenciación se realizó en el secuenciador HiSeq2500 (software de control HiSeq 2.2.58) utilizando el kit HiSeq SBS V4 para obtener lecturas de 50nt de extremo único (single-end) y un mínimo de  $6.5 \times 10^7$  lecturas por muestra.

La calidad de las lecturas sin procesar en formato FASTQ se verificó con el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Para cada muestra, las lecturas se alinearon contra el genoma humano (primary\_assembly, GRCh84.p5\_Homo\_sapiens.GRCh38.87) usando el programa con TopHat2 (Langmead et al. 2009). Los archivos de alineación predeterminados (BAM) se clasificaron e indexaron con la herramienta SAMtools (H. Li et al. 2009) y se visualizaron con el navegador genómico IGV (Integrated Genome Browser) (Robinson et al. 2011).

Las lecturas alineadas se asignaron a genes humanos utilizando la función htseq-count del paquete HTSeq (Anders et al. 2015) con parámetros predeterminados y usando genes completos (que incluye RNAm, RNA largos no codificantes y otros RNA) empleando como referencia el genoma humano (Ensembl annotation versión GRCh84.p5\_Homo\_sapiens.GRCh38.87.gtf). Dado el método empleado para la extracción del RNA total y la metodología de secuenciación, los microRNAs maduros no pudieron ser cuantificados.

### 3.7.2. Análisis estadístico de la expresión diferencial

La expresión diferencial entre las poblaciones control e infectadas en las distintas situaciones, se estimó mediante el paquete bioconductor DESeq2 (Love et al. 2014) usando como parámetro `cooksCutoff=FALSE`, aplicando la corrección para comparaciones múltiples de Benjamini-Hochberg para obtener la significancia estadística, calculando la probabilidad de falsos positivos (*False Discovery Rate*; FDR) (Benjamini & Hochberg 1995). Para visualizar gráficamente los resultados y establecer un filtro de FDR válido, se utilizó en primera instancia el visualizador FIESTA (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>), y se consideraron cambios estadísticamente significativos los transcritos que presentaron un  $FDR \leq 0.05$ . Para generar las listas de transcritos candidatos, los datos se filtraron según el FDR y los valores de  $\log_2FC$  como se describe en los resultados.

Cabe aclarar que los experimentos de Huh7<sub>pro</sub> sometidos a secuenciación masiva provienen de dos experimentos independientes realizados con reactivos análogos en 2017 y 2018. El análisis del segundo experimento permitió verificar de nuevo la erradicación del virus y la reproducibilidad de los datos obtenidos en el primer análisis. Por lo tanto, se unificaron los datos obtenidos en los dos experimentos independientes (n=4), ganando robustez con cuatro muestras analizadas por condición.

### 3.7.3 Análisis de sobrerrepresentación

Las listas de genes candidatos se sometieron a un análisis de sobrerrepresentación utilizando el servicio web Genetrail2 (Stöckel et al. 2016) para interrogar a diferentes bases de datos de anotaciones de genes y determinar el enriquecimiento estadísticamente significativo de funciones biológicas, vías, regulación por factores de transcripción o funciones moleculares. Las categorías se consideraron estadísticamente significativas para los valores de p-valor ajustado  $<0.01$ .

Las listas de transcritos significativamente alterados ( $FDR \leq 0.05$ ) entre las poblaciones infectadas y mock en cada tiempo y sistema de infección se sometieron a un análisis de sobrerrepresentación (ORA; del inglés *overrepresentation analysis*) utilizando GeneTrail2. GeneTrail2 es una plataforma web que permite el análisis integrado simultáneo de datos transcriptómicos interrogando diferentes bases de datos y anotaciones de genes públicas. A través de esta plataforma se realizaron análisis de sobrerrepresentación que permiten determinar el enriquecimiento estadísticamente significativo con un valor p-ajustado bajo el método de Benjamini/Yekutieli (Benjamini & Yekutieli 2001) en las bases de datos de Gene Ontology (Biological Process, Cellular Component, Molecular Function), KEGG-Pathways y Reactome-Pathways.

En el análisis inicial se generaron los datos de enriquecimiento con las cinco bases de datos anteriormente mencionadas, pero se seleccionó la base de datos KEGG-Pathways para el estudio que aquí se presenta, por ser la base de datos que engloba las funciones celulares en un menor número de categorías funcionales, 280.

Cada transcrito alterado se sitúa en las categorías funcionales en las que tiene un papel descrito (anotaciones manuales). Por lo tanto, cada categoría funcional presentará un nivel de sobrerrepresentación que vendrá dado por el p-value ajustado (Benjamini & Yekutieli 2001) de la relación entre el número de genes descritos para esa categoría y el número de transcritos que se asocian con ella. Las categorías funcionales se consideraron estadísticamente significativas para los valores de  $p < 0.05$ , siendo 3 el número de mínimo de proteínas que constituyen una categoría significativamente sobrerrepresentada (p-valor ajustado  $<0.05$ ).

### 3.7.4. Análisis estadístico y representación gráfica.

Los valores promedio y desviación estándar, así como los coeficientes de correlación se calcularon empleando el software Microsoft Excel. Las representaciones gráficas se realizaron con el mismo software. Los parámetros estadísticos referentes a la transcriptómica se calcularon según los descrito en la Apartado 3.7.2.

## 4. RESULTADOS

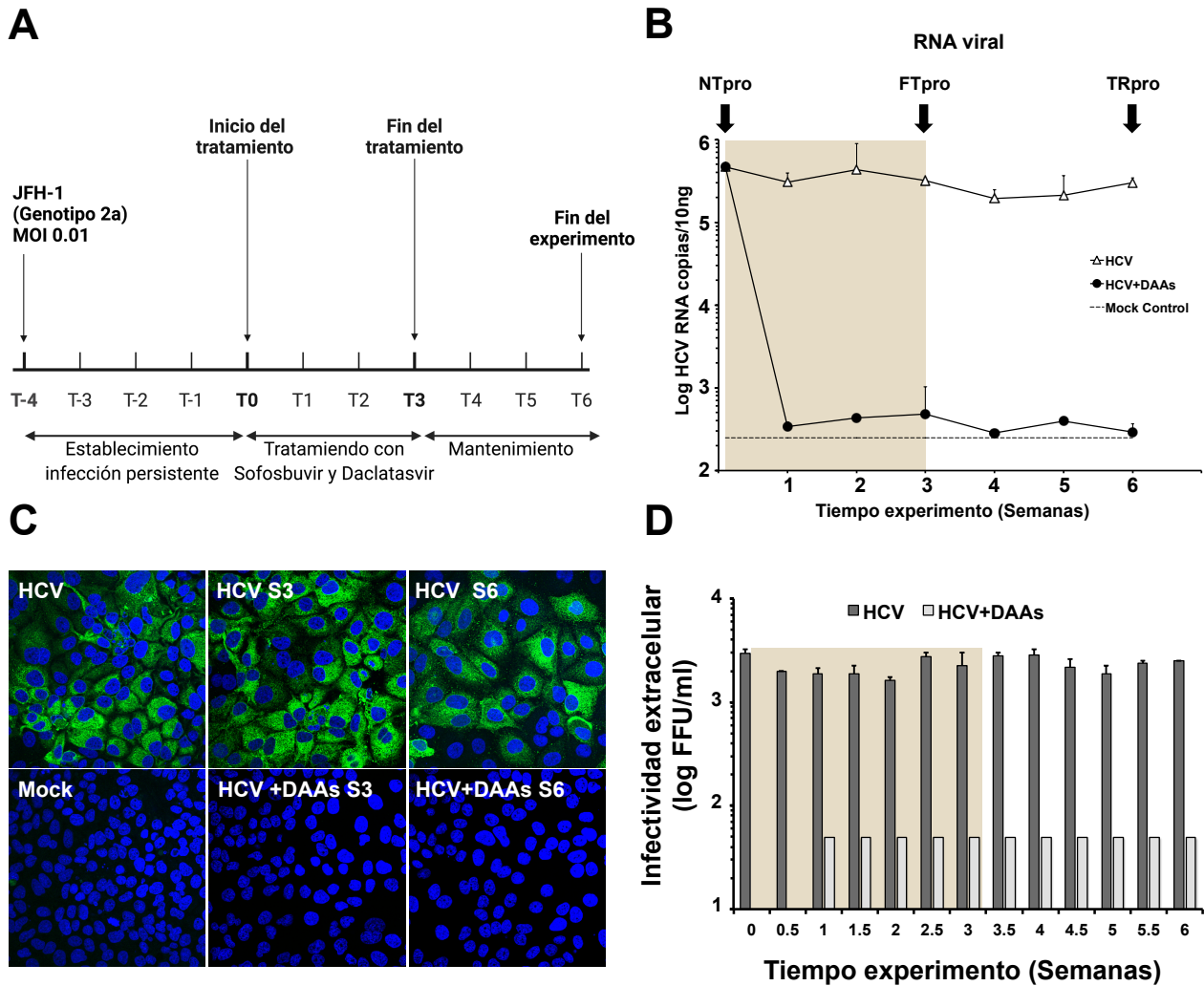
### 4.1. Erradicación de la infección persistente por HCV en cultivos celulares proliferativos y quiescentes mediante tratamiento con DAAs.

Actualmente, existen terapias altamente eficaces para erradicar el virus de la hepatitis C (HCV) en pacientes crónicamente infectados basadas en la combinación de antivirales de acción directa (DAAs) sobre la maquinaria de replicación viral (Apartado 1.1.3.). Su extraordinaria eficacia y su modo de acción hace que los mecanismos subyacentes a la eliminación del virus sean diferentes a anteriores terapias utilizadas. Por lo tanto, es posible que los pacientes tratados con DAAs, que se declaran virológicamente curados, presenten alteraciones irreversibles en el transcriptoma causadas por la infección crónica por HCV. Esta preocupación se ve reforzada por estudios en los que se ha observado que existe una alta tasa de recurrencia tumoral temprana en pacientes con HCC sometidos a terapia sin interferón (IFN) (Reig et al. 2016; Mariño et al. 2019).

Para determinar el impacto de la infección persistente por HCV sobre el transcriptoma de la célula hospedadora, se emplearon dos modelos de infección persistente de HCV en células de hepatoma humano (Huh-7). basados en modelos de cultivos proliferativos (Huh7<sub>pro</sub>) o cultivos quiescentes (Huh7<sub>DMSO</sub>), sometidos a un proceso de diferenciación parcial mediante adición de DMSO en el medio de cultivo (ver Materiales y métodos 3.1) (**Figura 4.1**). El motivo para utilizar estos dos modelos diferentes de infección persistente es el de poder determinar qué fenómenos inducidos por la infección requieren selección de subpoblaciones celulares por evolución dirigida (Huh7<sub>pro</sub>) y qué fenómenos son directamente atribuibles a una interacción directa del virus con la célula hospedadora en cultivos donde se minimizan fenómenos de selección poblacional (Huh7<sub>DMSO</sub>).

Las Huh7<sub>pro</sub> fueron inoculadas a baja multiplicidad de infección (MOI 0.01) con la cepa JFH-1, un virus HCV recombinante del genotipo 2a (Wakita et al. 2005) (Zhong et al. 2005), y se mantuvieron en cultivos sub-confluentes durante 4 semanas, pasando las células dos veces por semana en las condiciones estándar establecidas (Material y métodos XX) (Castro, Ávila-Pérez, et al. 2019). En paralelo se mantuvieron cultivos no infectados (*mock*) (**Figura 4.1A**). Tras 4 semanas en cultivo, la infección se propagó a la totalidad del cultivo, con al menos el 90% de las células expresando antígenos virales (**Figura 4.1C**). En ese momento, los cultivos de células infectadas y control se dividieron en dos, y en la mitad del cultivo se comenzó el tratamiento antiviral con DAAs, suplementando el medio completo con sofosbuvir (SOF; 1  $\mu$ M) y daclatasvir (DCV; 10 nM), que al inicio de estos estudios suponía una combinación clínicamente relevante (Sulkowski et al. 2014; D. R. Nelson et al. 2015).

## Huh7<sub>pro</sub>



**Figura 4.1. Erradicación de la infección persistente por HCV mediada por DAAs en cultivos de células Huh7 proliferativas.** **A)** Esquema de la infección persistente en células proliferativas (Huh7<sub>pro</sub>): las células Huh7 se inocularon a MOI 0.01 y se mantuvieron infectadas de forma persistente durante 4 semanas antes de ser tratadas con una combinación de SOF (1  $\mu$ M) y DCV (10 nM) durante un período de 3 semanas (área oscurecida). Se retiró el tratamiento y las células se incubaron adicionalmente durante 3 semanas más. Los cultivos se mantuvieron sub-confluentes dividiendo las células dos veces por semana. **B)** RNA viral intracelular de HCV medido en las diferentes poblaciones de células mediante RT-qPCR a partir de extracciones de RNA celular total. Los datos se muestran como media y desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por duplicado (n=4). Las flechas indican los momentos en los que se realizaron los análisis de RNAseq. **C)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran tinción del antígeno viral E2 (verde) y los núcleos (DAPI; azul) en las diferentes muestras. **D)** Título de infectividad extracelular se recogieron los distintos sobrenadantes y se titularon mediante dilución límite e inmunofluorescencia.

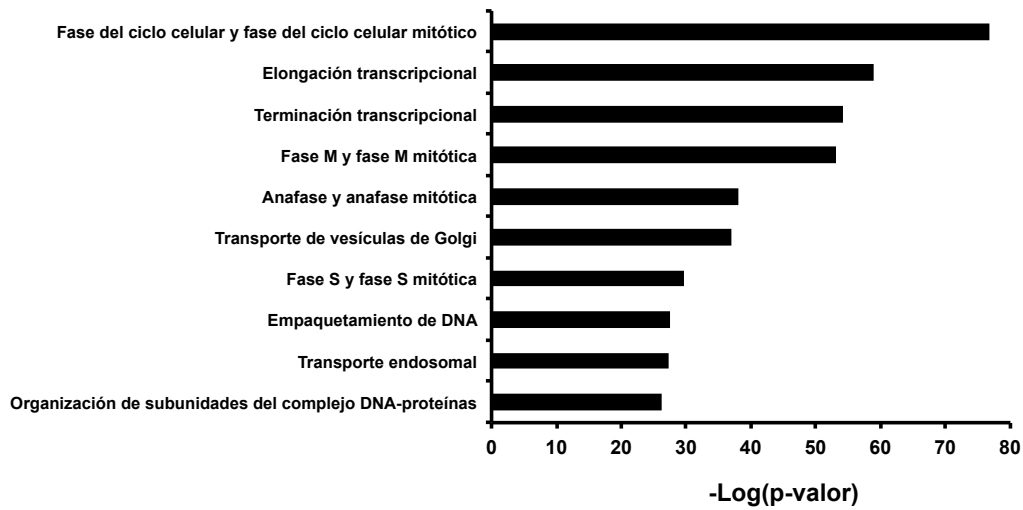
Las células se incubaron bajo este tratamiento con SOF y DCV durante 3 semanas, no siendo detectable mediante RT-qPCR el RNA viral desde la primera semana (Material y métodos XX) (**Figura 4.1B**). Tras este periodo de tratamiento, se mantuvieron cultivos *centinela* durante 3 semanas adicionales en medio completo sin DAAs para monitorizar la posible reactivación de la replicación de virus remanente. Posteriormente, se verificó la ausencia de RNA viral mediante RT-qPCR, confirmando la erradicación efectiva del virus (**Figura 4.1B**). En concordancia con la carga viral medida por RT-qPCR, los sobrenadantes de células infectadas presentaron niveles de infectividad en torno a  $10^3$  FFU/ml durante toda la duración del experimento, excepto en las células que fueron sometidas a tratamiento antiviral, donde no se observó virus infeccioso después del tratamiento con DAAs (**Figura 4.1D**). Igualmente se determinó la erradicación del virus en las células tratadas por la ausencia de la proteína viral E2 en su detección por microscopía de inmunofluorescencia (**Figura 4.1C**).

La naturaleza dinámica de las poblaciones celulares del sistema descrito anteriormente, plantea la posibilidad de que se produzcan fenómenos de selección de poblaciones celulares bajo presión selectiva del virus y/o del tratamiento. Para generar un modelo similar al anterior pero minimizando las dinámicas poblacionales celulares, se desarrollaron cultivos de células quiescentes (Huh7<sub>DMSO</sub>) mediante la adición de 2%DMSO en el medio completo y la utilización de placas de cultivo cubiertas con colágeno, tal y como se ha descrito anteriormente (Sainz & Chisari 2006; Bauhofer et al. 2012) (Material y métodos 3.4.2). Tras 2 semanas en presencia del 2%DMSO, dichos cultivos de células Huh-7 presentan características morfológicas y transcripcionales que sugieren diferenciación hacia células con rasgos hepáticos con una menor expresión de los transcritos implicados en la progresión del ciclo celular y una mayor expresión de genes supresores del crecimiento (**Figura 4.2**), tal y como se describe en publicaciones anteriores (Sainz & Chisari 2006; Choi et al. 2009; Bauhofer et al. 2012). Entre las características morfológicas de las Huh7<sub>DMSO</sub> destaca que se mantienen quiescentes, sin necesidad de pasar las células, a diferencia de lo que ocurre en las Huh7<sub>pro</sub>. Además, las características transcripcionales fueron analizadas a posteriori utilizando los datos obtenidos de la secuenciación masiva. Para ello, se comparó el transcriptoma de las Huh7<sub>pro</sub> *mock* y Huh7<sub>DMSO</sub> *mock* sin tratar ni infectar.

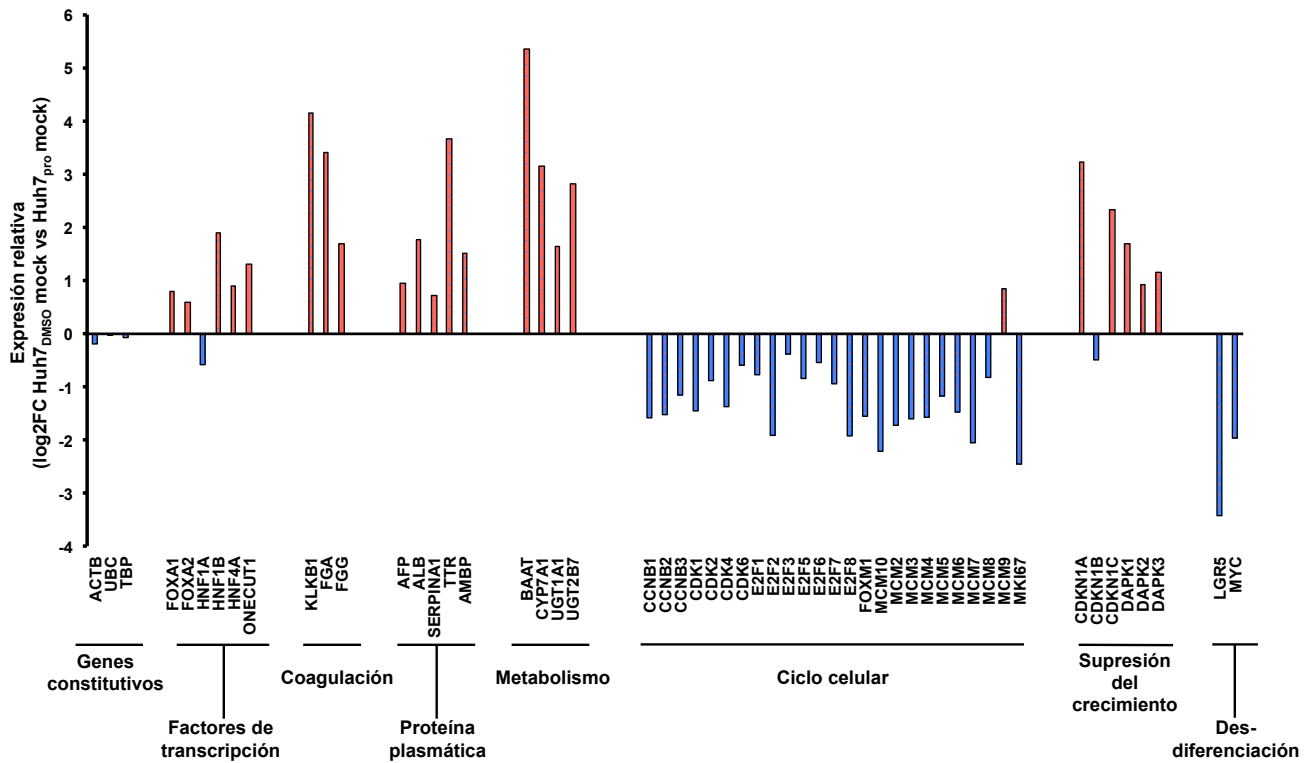
Puesto que el análisis y caracterización de las células Huh7 quiescentes en presencia de DMSO no es el objetivo principal de estas Tesis Doctoral, se describirán, sin entrar en detalles, las características principales observadas. En esta comparación se obtuvieron 10445 transcritos estadísticamente alterados (FDR<0.05) de los 58051 transcritos analizados, lo cual indica las grandes diferencias entre ambas líneas celulares. Estos transcritos están principalmente relacionados con los procesos biológicos asociados al ciclo



**A**



**B**



**Figura 4.2. Selección de características transcripcionales diferenciales entre células Huh7 quiescentes y proliferativas en ausencia de infección.** Comparación del transcriptoma de las Huh7<sub>pro</sub> *mock* y Huh7<sub>DMSO</sub> *mock* sin tratar ni infectar. **A)** Gráfico que representa algunos de los 2683 procesos biológicos sobrerrepresentados significativamente ( $p\text{-valor} < 0.05$ ) entre los 10445 transcritos alterados en las células Huh7<sub>DMSO</sub> *mock* respecto a las Huh7<sub>pro</sub> *mock*. **B)** Representación gráfica de la expresión relativa ( $\log_2FC$ ) de algunos transcritos seleccionados que permiten la caracterización de esta línea celular. Todos estos transcritos se encuentran alterados en las células Huh7<sub>DMSO</sub> *mock* respecto a las Huh7<sub>pro</sub> *mock*., excepto los genes constitutivos utilizados como control.



celular (**Figura 4.2A**). Entre los transcritos reprimidos en Huh7<sub>DMSO</sub> se encuentran 8 del complejo proteico de mantenimiento de minicromosomas (MCM) esencial para la replicación del DNA genómico (Bochman & Schwacha 2009) (**Figura 4.2B**). Además, entre los transcritos estadísticamente inducidos destacan el factor de transcripción HNF4A (Sainz & Chisari 2006) y las UDP-glucuronosiltransferasas UGT1A1 y UGT2B7 (Choi et al. 2009) asociadas previamente con este sistema de detención del crecimiento de Huh7 con DMSO (**Figura 4.2B**). En resumen, tanto las características morfológicas como las transcripcionales indican que se ha generado una línea estable de células Huh7 quiescentes.

Estos cultivos diferenciados se infectaron a MOI 10 con la cepa D183 (genotipo 2a), un virus HCV recombinante derivado de JFH-1 adaptado a cultivo celular (Zhong et al. 2006). A esta multiplicidad de infección, todas las células se infectan simultáneamente y el sistema alcanza títulos de progenie viral máximos a los 3 días post-infección (Zhong et al. 2006). La recogida de extractos celulares en Huh7<sub>DMSO</sub> está limitada por las células sembradas inicialmente, sin embargo los sobrenadantes fueron recogidos cada semana para determinar el título de infectividad extracelular, la cual se mantiene constante en torno  $1 \cdot 10^3$  FFU/ml en las infectadas a lo largo del experimento en las células infectadas sin tratar (**Figura 4.3D**). De esta manera, se pueden establecer infecciones persistentes que se pueden mantener en cultivo de manera prolongada, aunque limitada temporalmente por la diferenciación de las células Huh7<sub>DMSO</sub> (Sainz & Chisari 2006). La infección se mantuvo durante 2 semanas antes de tratar las células con DAAs. La mitad de las células sembradas, tanto infectadas como *mock*, se trataron con SOF (1  $\mu$ M) y DCV (10 nM) durante 2 semanas y se mantuvieron otras 2 semanas adicionales en medio completo con 2%DMSO en ausencia del tratamiento, como cultivos *centinela* para verificar la eliminación efectiva del virus (**Figura 4.3A**). Al igual que en Huh7<sub>pro</sub>, en este sistema se observa mediante RT-qPCR que el RNA viral se mantiene relativamente constante en las células persistentemente infectadas a lo largo de las 4 semanas que dura el experimento (**Figura 4.3B**). Sin embargo, en las células tratadas con DAAs se produce una reducción drástica de la carga viral de cerca de 4 ordenes de magnitud tras dos semanas con el tratamiento antiviral, que no revierte tras la retirada de los antivirales. Además, en todos los experimentos se monitorizó el número de células infectadas mediante la detección por microscopía de inmunofluorescencia de la proteína viral E2. Como ocurría en Huh7<sub>pro</sub>, las poblaciones infectadas y sin tratar en las Huh7<sub>DMSO</sub> presentan al menos un 80% de la población positiva al antígeno viral E2, mientras que las poblaciones HCV tratadas con DAAs al igual que las células no infectadas (*mock*) no presentaban ninguna célula positiva (**Figura 4.3C**). Como ocurre con el RNA viral la infectividad extracelular se mantiene

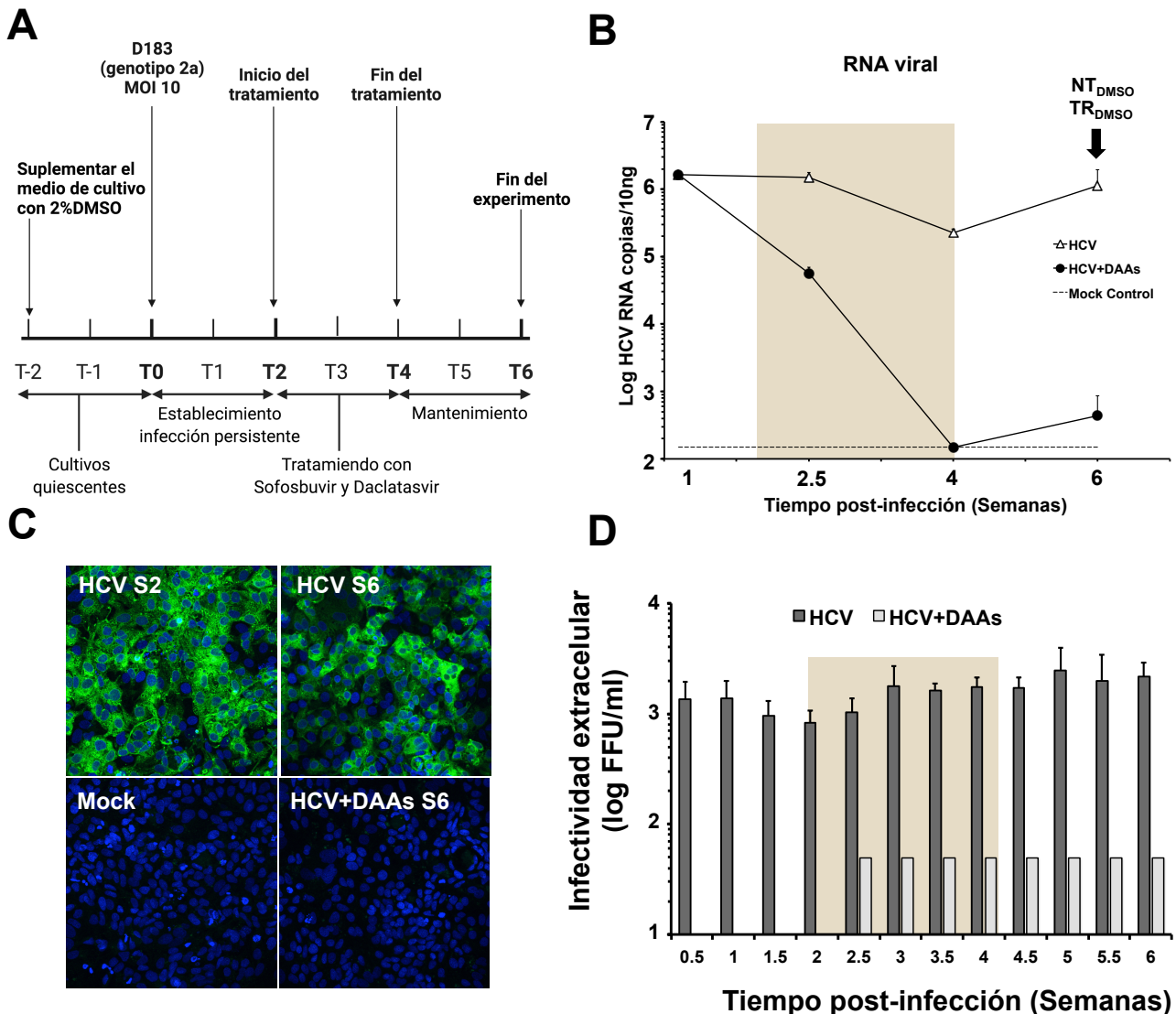
constante en las células infectadas, mientras que en las células tratadas con DAAs, la progenie viral resulta indetectable tanto en presencia del tratamiento como tras la retirada de los antivirales (**Figura 4.3D**).

Estos resultados demuestran que tanto en cultivos celulares proliferativos como quiescentes de Huh7 persistentemente infectadas la adición de una combinación de SOF/DCV en el medio de cultivo es capaz de eliminar el RNA viral, la expresión del antígeno viral E2 y la producción de progenie viral. Por lo que estos datos sugieren que los DAAs son capaces de erradicar la infección persistente en cultivos celulares *in vitro* al no reactivarse la replicación viral una vez retirado el tratamiento (**Figuras 4.1 y 4.3**).

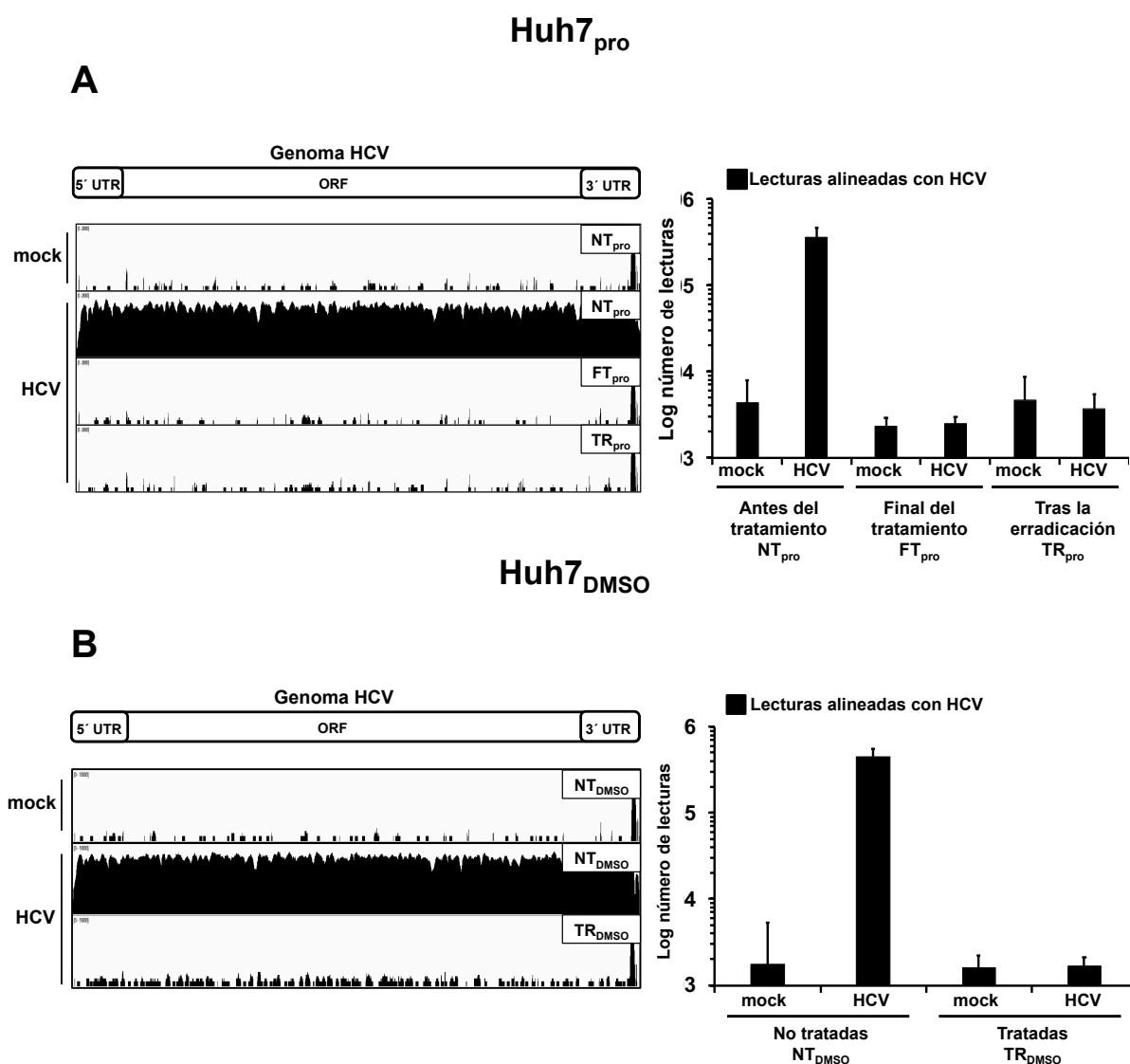
Con el objetivo de determinar el impacto de la infección sobre el perfil transcriptómico de las poblaciones de Huh7<sub>pro</sub> y Huh7<sub>DMSO</sub>, las muestras de RNA total extraídas de ambos sistemas fueron sometidas a secuenciación masiva (RNA-seq), tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 3.7). En las células proliferativas se analizaron las replicas biológicas (n=4) de células infectadas persistentemente durante 4 semanas antes de comenzar el tratamiento con DAAs (Huh7<sub>pro</sub> no tratadas; NT<sub>pro</sub>), tras finalizar el tratamiento de tres semanas (Huh7<sub>pro</sub>, final de tratamiento; FT<sub>pro</sub>) y tres semanas después de retirar el tratamiento (Huh7<sub>pro</sub> tratadas; TR<sub>pro</sub>) y sus respectivas células *mock* control de cada tiempo (**Figura 4.1B**). En el caso de las células quiescentes, se analizaron las replicas biológicas (n=3) a tiempo final de células infectadas no tratadas (Huh7<sub>DMSO</sub> no tratadas; NT<sub>DMSO</sub>) o tratadas con los DAAs e incubadas 2 semanas en ausencia de tratamiento (Huh7<sub>DMSO</sub> tratadas; TR<sub>DMSO</sub>) y sus respectivas células control (**Figura 4.3B**).

Los datos procedentes del RNA-seq fueron procesados para determinar el número de lecturas alineadas en cada situación experimental con el genoma de referencia de HCV (AB047639.1) para analizar la erradicación del virus (Material y métodos 3.7.1). Los datos de RNA-seq confirman una eliminación total del RNA viral, incluso de fragmentos subgenómicos que pudieran no ser detectados por los cebadores empleados en la RT-qPCR. Los resultados de alineamiento con el genoma viral se representan a través de *Sashimi Plots* y la cuantificación del total de lecturas alineadas por muestra (**Figura 4.4**). El alineamiento con el genoma de HCV únicamente se produce de manera significativa en las Huh7<sub>pro</sub> y Huh7<sub>DMSO</sub> infectadas sin tratar (HCV NT), siendo el resto de alineamientos computados falsos positivos ya que se obtienen valores semejantes al de células *mock* sin infectar (**Figura 4.4**). Estos resultados demuestran que no se detectan transcritos virales en las células infectadas y posteriormente tratadas con DAAs tanto en las células proliferativas como quiescentes. Además, tampoco no se observa acumulación de RNA viral de HCV tras la retirada del tratamiento, lo que sugiere que el tratamiento con los DAAs bloquea eficazmente la replicación del virus lo que lleva a su erradicación.

## Huh7<sub>DMSO</sub>



**Figura 4.3. Erradicación de la infección persistente por HCV mediada por DAAs en cultivos de células Huh7 quiescentes.** **A)** Esquema Infección persistente en células quiescentes (Huh7<sub>DMSO</sub>): las células Huh7 se sembraron en placas pre-tratadas con colágeno y suplementando el medio completo con 2% DMSO. Después de dos semanas en presencia del 2% DMSO, se inocularon a MOI 10 y se mantuvieron infectadas de forma persistente 2 semanas antes de ser tratadas con una combinación de SOF (1  $\mu$ M) y DCV (10 nM) durante 2 semanas (área oscurecida). Se retiró el tratamiento y las células se mantuvieron adicionalmente durante 2 semanas más. **B)** RNA viral intracelular de HCV medido en las diferentes poblaciones de células mediante RT-qPCR a partir de extracciones de RNA celular total. Los datos se muestran como media y desviación estándar de tres replicas biológicas (n=3). Las flechas indican los momentos en los que se realizaron los análisis de RNAseq. **C)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran tinción del antígeno viral E2 (verde) y los núcleos (DAPI; azul) en las diferentes muestras. **D)** Título de infectividad extracelular se recogieron los distintos sobrenadantes y se titularon mediante dilución límite e inmunofluorescencia.



## 4.2. Análisis de las alteraciones transcripcionales en células no infectadas por la presencia de los DAAs

Antes de analizar el impacto de la infección sobre la célula hospedadora, es necesario determinar si el tratamiento con DAAs y/o el cultivo prolongado de las poblaciones celulares tienen un efecto sobre el transcriptoma de células no infectadas. Para ello, se comparó en ambos sistemas de cultivo el transcriptoma de las células Huh7 *mock* no infectadas tratadas con DAAs con el de las no tratadas. En las Huh7<sub>pro</sub> se generaron tres comparaciones

posibles en ausencia de infección (*Mock* FT/NT, *Mock* TR/NT y *Mock* TR/ FT) y en las Huh7<sub>DMSO</sub> se realizó una única comparación (*Mock* TR/NT).

Las lecturas generadas mediante RNA-seq de las muestras de células *mock* (tratadas y sin tratar) en células Huh7<sub>pro</sub> y Huh7<sub>DMSO</sub> se alinearon con el genoma humano y se determinó la abundancia relativa de cada transcrito identificado, expresada como el ratio de los valores de expresión en logaritmo base 2 (log2FC) en células *mock* tratadas versus células *mock* sin tratar. En cada una de estas cuatro comparaciones se analizaron los transcritos significativamente alterados (FDR≤0.05), tal y como se describe en los métodos (Material y métodos 3.7.2) (**Tabla 4.1**).

**Tabla 4.1**

Sistema de cultivo	Proliferativos (Huh7 <sub>pro</sub> )			Quiescentes (Huh7 <sub>DMSO</sub> )
	<i>Mock</i> FT/NT	<i>Mock</i> TR/NT	<i>Mock</i> TR/FT	<i>Mock</i> TR/NT
Número total de transcritos significativamente alterados	33	129	1	45
Transcritos inducidos	17	52		11
Transcritos reprimidos	16	77	1	34

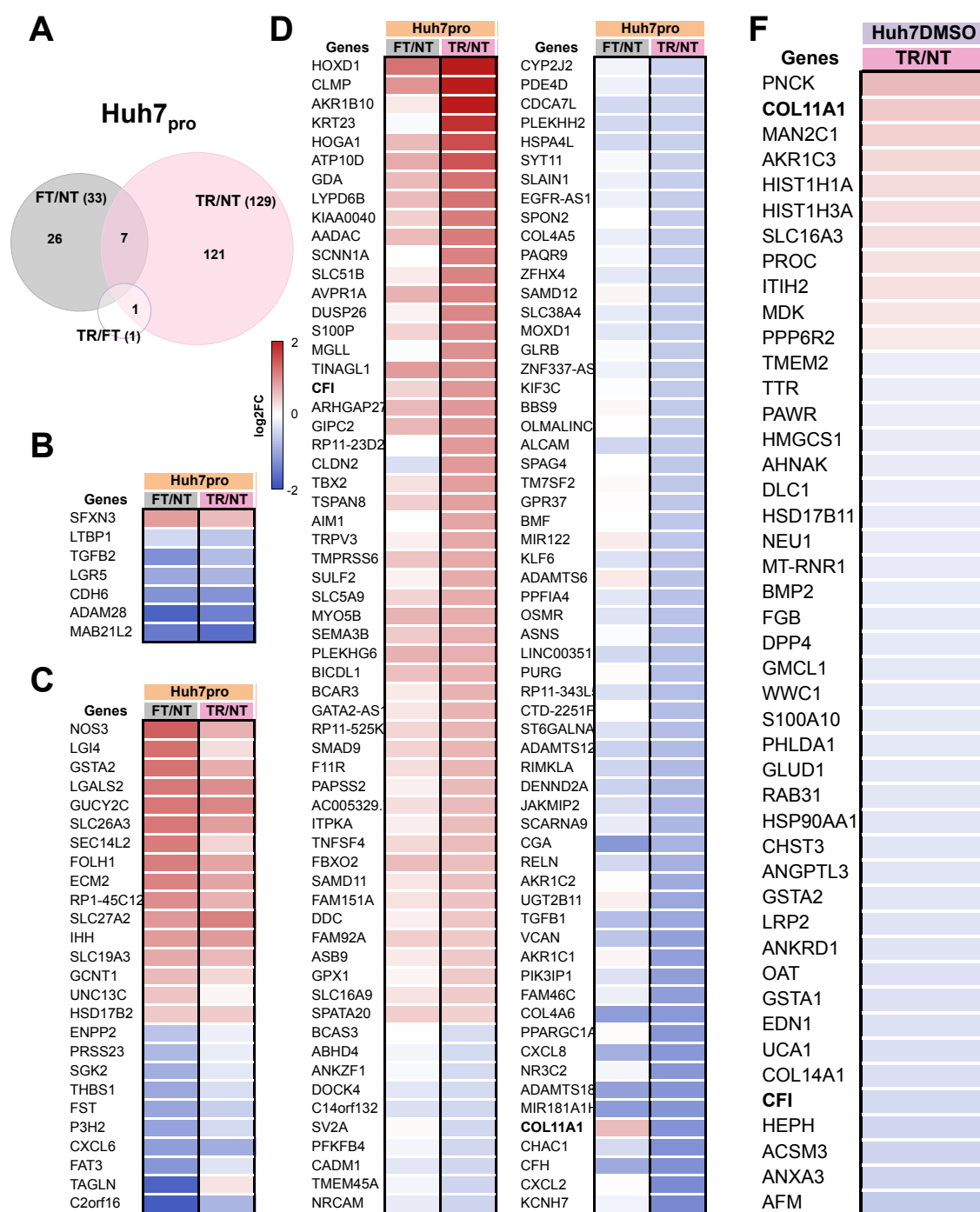
En las Huh7<sub>pro</sub> entre las poblaciones *Mock* TR y *Mock* FT se encuentra alterado un único transcrito (ADAMTS6) (**Figura 4.5A**), lo que sugiere que apenas existen diferencias entre las poblaciones tratadas con DAAs. Por lo tanto, se analizaron con mayor detenimiento las diferencias de estas dos poblaciones respecto a la población inicial *Mock* NT. Destacando que 7 transcritos se encuentran alterados de manera significativa en la misma dirección en *Mock* FT y *Mock* TR (SFXN3, LTBP1, LGR5, CDH6, TGFB2, MAB21L2, ADAM28) (**Figura 4.5B**). Además, en la población *Mock* FT, al final del tratamiento, se observan 26 transcritos significativamente alterados respecto a la población *Mock* NT, con cambios de niveles de expresión (log2FC) que varían en el rango de -1.85 a +1.4 (**Figura 4.5C**). Sin embargo, tras la retirada del tratamiento el número de transcritos significativamente alterados en *Mock* TR aumentó hasta los 121 con un log2FC que varía en el rango de -1.64 a +2.16 (**Figura 4.5D**). Los 7 transcritos significativamente alterados en *Mock* FT y *Mock* TR respecto a la población inicial *Mock* NT sugieren que el tratamiento con DAAs produce alteraciones

transcripcionales en la población de células no infectadas que se mantienen tras tres semanas desde la retirada del tratamiento. Los otros 122 transcritos alterados en *Mock TR* no están asociados a la presencia de los DAAs (**Figura 4.5D**).

En Huh7<sub>DMSO</sub> existen 45 transcritos significativamente alterados entre las poblaciones *Mock NT* y *Mock TR* (**Figura 4.5F**), aunque los cambios de niveles de expresión (log2FC) son relativamente pequeños y varían en el rango de -0.6 a 0.62, estos transcritos alterados se encuentran ligados al periodo de 2 semanas de tratamiento en presencia de DAAs en ausencia de proliferación, por lo que se descarta la evolución poblacional y se asume un impacto directo de los DAAs sobre la expresión de estos genes. Analizando los transcritos alterados en los dos sistemas de cultivo de los 129 de *Mock TR/NT* en Huh7<sub>pro</sub> y los 45 transcritos de *Mock TR/NT* en Huh7<sub>DMSO</sub> no se encuentra ningún transcrito regulado de manera similar.

La ausencia de transcritos comunes entre los dos sistemas, sugiere que las alteraciones producidas por los DAAs no repercuten de manera sustancial en los transcriptomas correspondientes a células no infectadas en los distintos sistemas de cultivo celular. Además, junto con las mayores diferencias en magnitud y número de transcritos en *Mock TR/NT* de Huh7<sub>pro</sub> (**Tabla 4.1**) refuerzan la hipótesis de que las diferencias observadas en las Huh7<sub>pro</sub> podrían ser la consecuencia de una deriva poblacional diferencial en presencia/ausencia de DAAs, lo cual es esperable en cultivo celulares proliferativos donde se somete a selección a poblaciones celulares en los que se elimina una parte importante de la población dos veces por semana durante al menos seis semanas (ver Materiales y Métodos 3.4.1).

Estos datos se considerarán en los análisis subsiguientes. No obstante, y para minimizar el impacto de esta diferencias entre poblaciones en el análisis de expresión diferencial, se utilizarán como referencia las células control de cada tiempo (*Mock NT*, *Mock FT* y *Mock TR*) para analizar las diferencias en el transcriptoma celular entre las células *mock* y las infectadas por HCV en las Huh7<sub>pro</sub>.



**Figura 4.5. Alteraciones transcripcionales en células no infectadas antes y después del tratamiento con DAAs.** **A)** Diagrama de Venn que representa el número de transcritos expresados diferencialmente ( $FDR \leq 0.05$ ) en las células *mock* Huh7<sub>pro</sub> por condición y el número de transcritos que se superponen entre las diferentes condiciones. **B)** Transcritos significativamente alterados en la misma dirección en Huh7<sub>pro</sub> *Mock* FT/NT y *Mock* TR/NT. **C)** Transcritos significativamente alterados en la misma dirección en Huh7<sub>pro</sub> *Mock* FT/NT. **D)** Transcritos significativamente alterados en la misma dirección en Huh7<sub>pro</sub> *Mock* TR/NT. **E)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas significativamente en Huh7<sub>pro</sub> por los transcritos alterados entre las poblaciones tratadas (*Mock* TR) y las no tratadas (*Mock* NT). **F)** Transcritos significativamente alterados en la misma dirección en Huh7<sub>DMSO</sub> *Mock* TR/NT. **G)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas significativamente en Huh7<sub>DMSO</sub> por los transcritos alterados entre las células tratadas (*Mock* TR) y las no tratadas (*Mock* NT).

#### 4.3. Existen alteraciones transcripcionales en células persistentemente infectadas por HCV antes y tras de la erradicación del virus

El siguiente objetivo, y el principal de esta Tesis Doctoral, fue determinar el impacto de la infección sobre la célula hospedadora, determinando si existen alteraciones en el transcriptoma de las células persistentemente infectadas por HCV y si la erradicación de la infección es suficiente para normalizar la expresión génica de las células virológicamente curadas.

Para realizar un estudio transcriptómico no sesgado, las lecturas generadas mediante RNA-seq de las células *mock* e infectadas en células Huh7<sub>pro</sub> y Huh7<sub>DMSO</sub> (indicadas con fechas la Figura 4.1B y 4.3B) se alinearon con el genoma humano (GRCh38; ver Materiales y Métodos 3.7) y se determinó la abundancia relativa de cada transcrito identificado, expresada como el ratio de los valores de expresión en logaritmo base 2 ( $\log_2FC$ ) en células infectadas versus células *mock*. Dado el método empleado para la extracción del RNA total y la metodología de secuenciación, se consideraron transcritos correspondientes a RNAs codificantes de proteínas (mRNAs), de precursores de microRNAs (pri-miRNAs) y RNAs largos no codificantes (lncRNAs), no pudiendo ser cuantificados los microRNAs maduros.

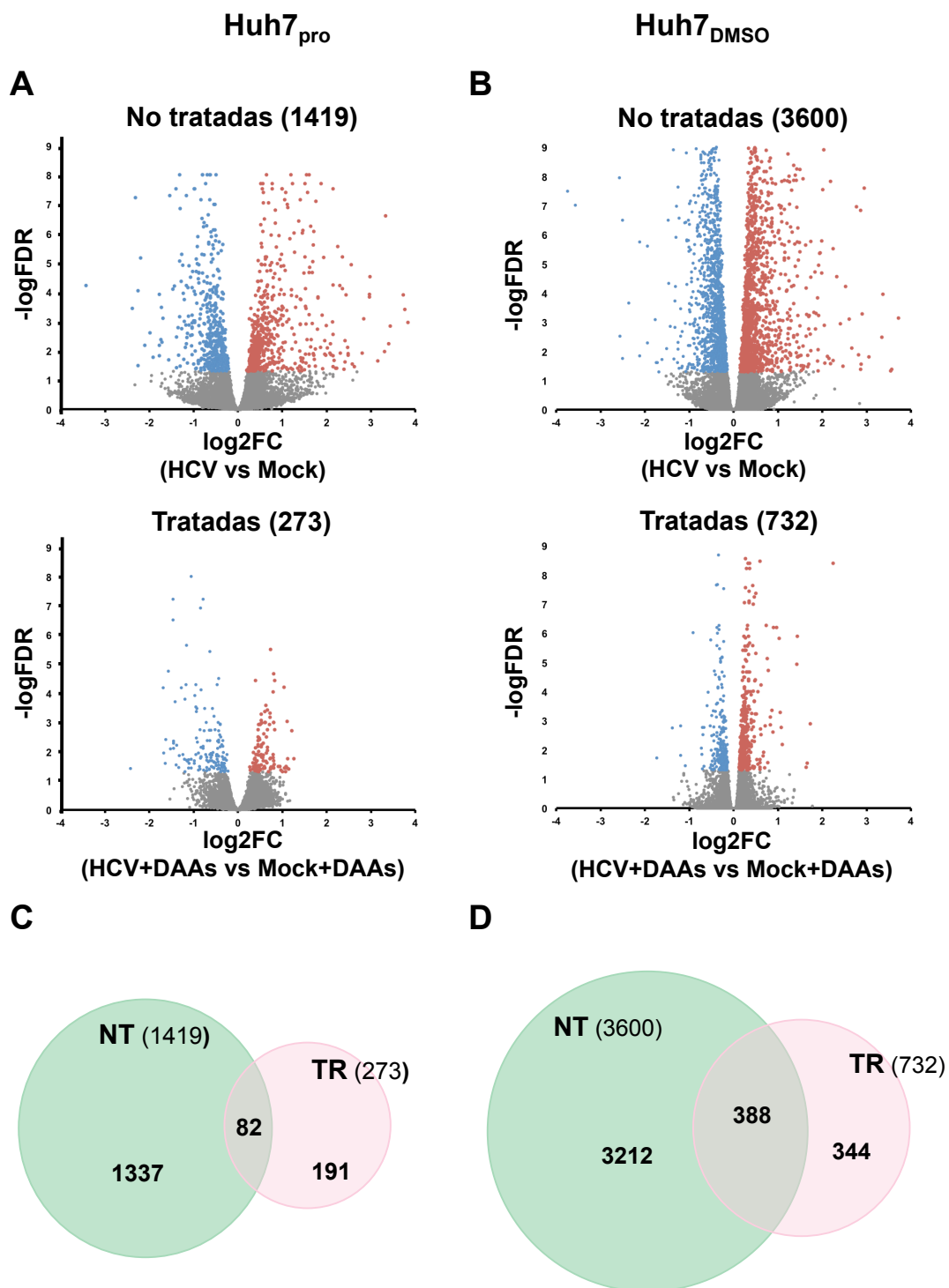
Se determinó la significación estadística de la expresión de cada transcrito entre las poblaciones control e infectadas en las distintas situaciones expresada como FDR (del inglés *False Discovery Rate*), tal y como se describe en los métodos (Material y métodos 3.7). Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias entre células infectadas y no infectadas con un  $FDR \leq 0.05$  y se denominan en este estudio como transcritos “**alterados**” (Tabla 4.2) . Para verificar la ausencia de cambios se impuso un criterio estadístico ( $FDR > 0.05$ ) y un cambio de magnitud arbitrario ( $-0.2 \leq \log_2FC \leq 0.2$ ) con el objeto de identificar transcritos que presentan niveles de expresión similares a los de las células control, a partir de ahora denominados “**normales**”.



**Tabla 4.2**

Sistema de cultivo	Proliferativos (Huh7 <sub>pro</sub> )			Quiescentes (Huh7 <sub>DMSO</sub> )	
	NT <sub>pro</sub> (antes del tratamiento)	FT <sub>pro</sub> (al final del tratamiento)	TR <sub>pro</sub> (tras la erradicación)	NT <sub>DMSO</sub> (no tratadas)	TR <sub>DMSO</sub> (tratadas)
Número total de transcritos alterados	1419	103	273	3600	732
Transcritos inducidos	784 (55%)	34 (33%)	115 (42%)	1850 (51%)	463 (63%)
Transcritos reprimidos	635	69	158	1750	269

En el modelo de infección persistente en los cultivos proliferativos, Huh7<sub>pro</sub>, (**Tabla 4.2; Figura 4.6A**) se identificaron 1419 transcritos **alterados** antes del tratamiento (NT<sub>pro</sub>), lo que sugiere que la infección persistente por HCV induce numerosos cambios transcriptómicos en la célula hospedadora, tal y como se esperaba dados los datos obtenidos en modelos similares de infección aguda por HCV (Diamond et al. 2010) (Luna et al. 2015) (Lupberger et al. 2019). Al comparar los conjuntos de datos de las células persistentemente infectadas antes y tras la eliminación de la infección con DAAs (NT<sub>pro</sub> y TR<sub>pro</sub>), se observó que un gran número (767/1419; 54%) de los transcritos **alterados** por la infección regresa a niveles **normales** tras la erradicación del virus, indicando que el tratamiento contribuye a la normalización de la expresión génica de la célula hospedadora. Muchos de éstos (459/767; 59.8%), ya habían regresado a niveles **normales** al finalizar el tratamiento (FT<sub>pro</sub>). Sorprendentemente, 273 transcritos aparecen **alterados** tras la erradicación del virus (TR<sub>pro</sub>), desde ahora definidos como “**permanentemente alterados**”, empleando el término “**permanente**” como convención en este contexto y para transcritos que aparecen alterados en células curadas virológicamente (**Figura 4.1**).



**Figura 4.6. Alteraciones transcripcionales en células persistentemente infectadas por HCV antes y después de la erradicación del virus mediante tratamiento con DAAs.**

**A)** Huh7<sub>pro</sub>- **B)** Huh7<sub>DMSO</sub>- *Vulcano Plots* que representan los transcritos expresados diferencialmente entre las células infectadas con HCV y las células control antes y después del tratamiento con DAA. Se muestran los transcritos significativamente ( $FDR \leq 0.05$ ) reprimidos (azul) e inducidos (rojo) como  $\log_2FC$  frente a  $-\log FDR$  calculados en Huh7<sub>pro</sub> a partir de dos experimentos independientes realizados por duplicado ( $n = 4$ ) y en Huh7<sub>DMSO</sub> a partir de tres replicas biológicas de un único experimento ( $n=3$ ). **C)** Huh7<sub>pro</sub>- **D)** Huh7<sub>DMSO</sub>- Diagrama de Venn que representa el número de transcritos expresados diferencialmente ( $FDR \leq 0.05$ ) por condición y el número de transcritos que se superponen entre las diferentes condiciones.

Al desglosar los datos de expresión diferencial en TR<sub>pro</sub> y compararlos con NT<sub>pro</sub> (**Figura 4.6C**), se han podido identificar 82 transcritos **permanentemente alterados** (**Figura S4.1**), asociados a la replicación de HCV y que se mantienen alterados tras la eliminación del virus, aunque 14 lo hacen en dirección opuesta. Es decir, son genes cuya abundancia aumenta durante la infección y que aparecen como menos abundantes tras el tratamiento o viceversa. Sorprendentemente, la mayoría (107/273) de los transcritos **permanentemente alterados**, son **normales** durante la infección persistente (NT<sub>pro</sub>), sugiriendo que existen mecanismos asociados con el proceso de eliminación del virus y no únicamente a la replicación viral *per se* por los que se establecen alteraciones transcriptómicas permanentes en Huh7<sub>pro</sub>. La presencia de transcritos **permanentemente alterados** sugiere que el tratamiento con DAAs no es capaz de revertir completamente el impacto de la infección sobre el transcriptoma del hospedador, a pesar de haber eliminado el virus en los cultivos Huh7<sub>pro</sub>.

Por otro lado, en los cultivos quiescentes, Huh7<sub>DMSO</sub>, (**Tabla 4.2; Figura 4.6B**) se identificaron 3600 transcritos **alterados** en las células infectadas sin tratar (NT<sub>DMSO</sub>), lo que refuerza el concepto de que la replicación por HCV altera profundamente el transcriptoma de las células persistentemente infectadas.

Tras la erradicación del virus (TR<sub>DMSO</sub>), existen 732 transcritos **permanentemente alterados**. Estos datos sugieren que también en Huh7<sub>DMSO</sub> la infección persistente por HCV genera alteraciones permanentes en el transcriptoma celular, aunque el tratamiento con DAAs elimina el virus (**Figura 4.3**).

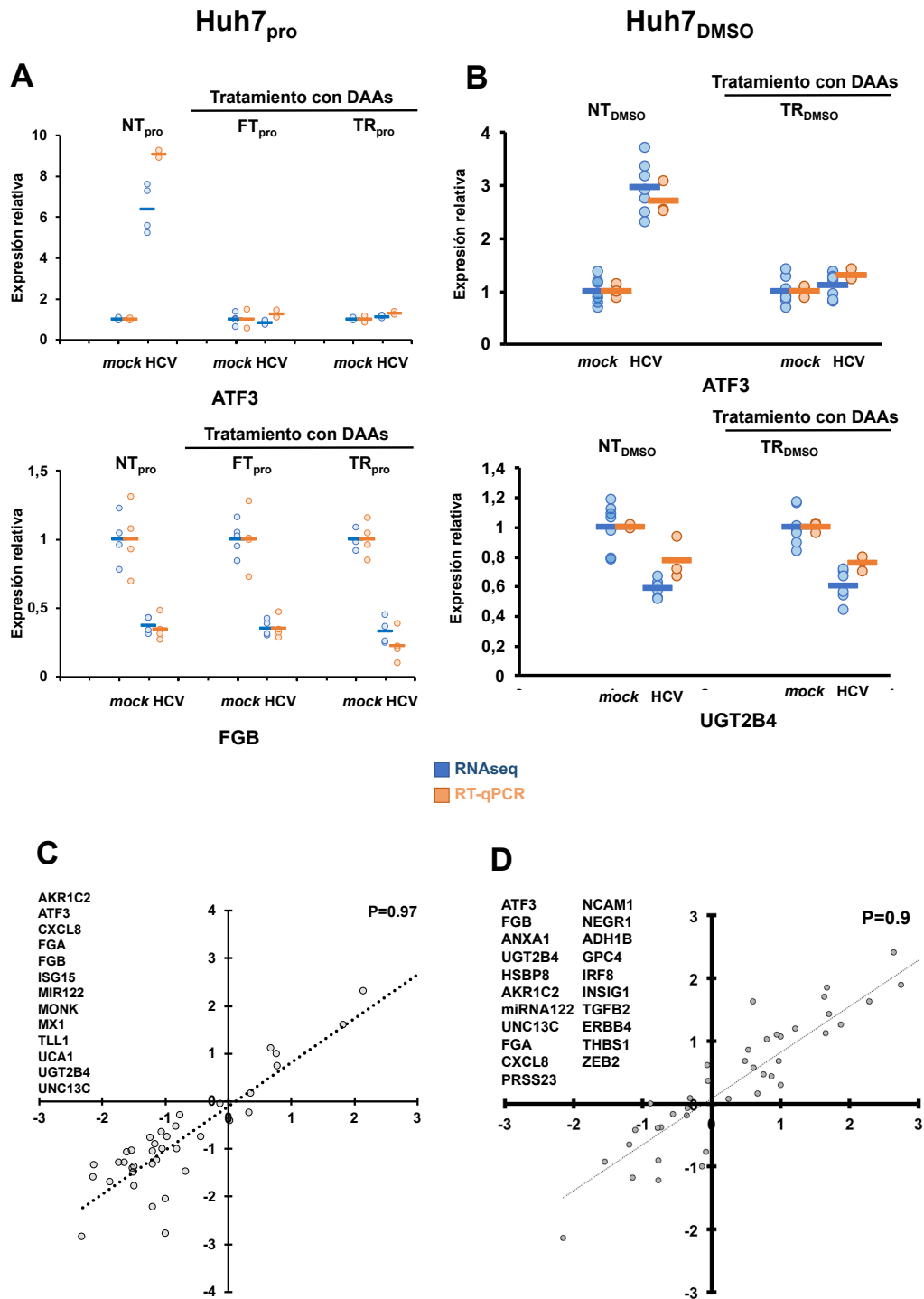
Al comparar los datos de expresión diferencial obtenidos en las células curadas con DAAs (TR<sub>DMSO</sub>) con los de células infectadas (NT<sub>DMSO</sub>) (**Figura 4.6D**), un 74% (2690/3600) de los transcritos **alterados** durante la infección presenta niveles **normales** de expresión en las células curadas. Estos resultados sugieren que la eliminación de la infección conlleva una regresión notable de las alteraciones transcriptómicas inducidas por el virus. Sin embargo, 388 transcritos desregulados por la infección persistente por HCV se establecen como **permanentemente alterados** tras la erradicación del virus. La mayoría de estos transcritos **permanentemente alterados** (281/388) se encuentran alterados en la misma dirección que durante la infección persistente (**Figura S4.2A**), mientras que 107 transcritos cambian de dirección (**Figura S4.2B**). Además, existen 344 transcritos **permanentemente alterados** tras la erradicación del virus, de los cuales casi el 90% (308 transcritos) eran **normales** durante la infección persistente por HCV, lo que sugiere de nuevo que existen mecanismos asociados al proceso de eliminación del virus y no a la replicación activa *per se* por los que se establecen alteraciones transcriptómicas permanentes.

En resumen, estos resultados en ambos sistemas de infección sugieren que en torno a un 6-10% de los transcritos alterados por la infección persistente se encuentran **permanentemente alterados** tras la erradicación del virus (**Figuras 4.6C y 4.6D**). La presencia de numerosas alteraciones transcriptómicas no relacionadas con la replicación viral indican una adaptación de la célula curada virológicamente a una nueva homeostasis (**Figuras 4.6C y 4.6D**).

Para verificar los resultados del RNA-seq, se seleccionaron 13 genes candidatos en base a los datos obtenidos en las Huh7<sub>pro</sub> y se validaron por RT-qPCR (Material y Métodos 3.6.2). Como ejemplo de transcrito **alterado** por la infección que presenta niveles **normales** tras la erradicación del virus, se muestra el perfil transcriptómico de ATF3 en células *mock* e infectadas. Tanto por RNA-seq como por RT-qPCR ATF3 está inducido por la infección por HCV antes del tratamiento, tal y como se ha publicado anteriormente (LIU et al. 2015; Chusri et al. 2016), y tras la erradicación del virus vuelve a su estado basal con niveles de expresión similares a las células control (**Figura 4.7A**). Sin embargo, FGB se encuentra **alterado permanentemente** tras la erradicación del virus (**Figura 4.7A**). Comparando los valores obtenidos en el RNA-seq y los analizados mediante RT-qPCR, se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson en Huh7<sub>pro</sub> de 0.9, lo que indica una asociación positiva y permite validar los datos obtenidos en el RNA-seq (**Figura 4.7B**).

Se realizó un ejercicio de validación semejante con un conjunto de transcritos candidatos elegido en el set de datos de las Huh7<sub>DMSO</sub>, obteniéndose un coeficiente de correlación satisfactorio (Pearson's=0.9). De manera análoga a los mostrado en la validación de los datos de Huh7<sub>pro</sub>, se muestra cómo los niveles de ATF3 se encuentran también **alterados** por la infección y cómo tras la erradicación del virus presenta niveles **normales** en Huh7<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.7C**). Al igual que en Huh7<sub>pro</sub>, FGB presenta regulación a la baja de manera permanente, tal y como se había predicho a partir del RNA-seq (**Figura 4.7C**). (**Figura 4.7D**). Esta detección independiente por RT-qPCR de varios transcritos celulares alterados por la infección persistente por HCV refuerzan y validan tanto los aspectos técnicos como de análisis bioinformático de los datos del RNA-seq.

Estos resultados confirman que la infección por HCV induce cambios significativos en el transcriptoma de la célula hospedadora, la mayoría de los cuales revierten al estado basal después de eliminar el virus con un tratamiento basado en DAAs. Sin embargo, algunos transcritos permanecen alterados de manera inesperada a pesar de la erradicación del virus, sugiriendo que HCV podría causar alteraciones permanentes en el transcriptoma de la célula hospedadora.



**Figura 4.7. Validación mediante RT-qPCR de las alteraciones transcripcionales en células persistentemente infectadas por HCV antes y después de la erradicación de la infección mediante tratamiento con DAAs.** Validación técnica de datos de RNA-seq por RT-qPCR utilizando cebadores para los transcritos seleccionados. Cada punto de datos se deriva de réplicas biológicas duplicadas (Huh7<sub>pro</sub>) o triplicadas (Huh7<sub>DMSO</sub>). **A)** Huh7<sub>pro</sub>- **B)** Huh7<sub>DMSO</sub>- Ejemplos seleccionados de dos de los transcritos validados por RT-qPCR en Huh7<sub>pro</sub> y Huh7<sub>DMSO</sub>. Los datos individuales de RNA-seq (azul) y RT-qPCR (naranja) se muestran como valores relativos en comparación con las muestras simuladas correspondientes. Los valores medios se indican con una barra horizontal del color correspondiente. **A)** Huh7<sub>pro</sub>- **B)** Huh7<sub>DMSO</sub>- Coeficiente de correlación de Pearson entre la expresión relativa en RT-qPCR y los datos obtenidos del RNA-seq.

Para analizar estos datos en profundidad y tratar de inferir su relevancia biológica, en los próximos apartados se explicará en detalle la metodología y las motivaciones que se emplearon para los diferentes análisis bioinformáticos.

Como resumen, en primer lugar se tomaron las listas de transcritos que presentan expresión diferencial ( $FDR \leq 0.05$ ) con respecto a sus controles correspondientes antes y después de la eliminación de la infección para identificar procesos biológicos sobrerrepresentados en las diferentes situaciones con el fin de integrar todas las alteraciones observadas en procesos biológicos anotados (Apartado 4.4). En un proceso subsiguiente, se determinó el perfil de cada uno de los transcritos alterados y agrupándolos en función de su reversibilidad en cada uno de los sistemas para estudiar diferentes mecanismos por los que se establecen dichos cambios transcripcionales (Apartado 4.5). Y por último, se examinó la relación de los datos obtenidos en cultivo celular con los obtenidos en estudios de biopsias de hígado de pacientes crónicamente infectados tanto antes como tras el tratamiento con DAAs (Apartado 4.6).

#### 4.4. Los análisis de sobrerrepresentación indican funciones celulares permanente alteradas tras la eliminación del virus

El objetivo de este primer estudio fue determinar si las alteraciones transcriptómicas observadas informan sobre procesos biológicos que se dan en las células persistentemente infectadas antes y después del tratamiento con DAAs. Para ello, se sometieron las diferentes listas de genes alterados a un análisis de sobrerrepresentación (ORA; del inglés *over-representation analysis*), considerando las alteraciones transcriptómicas asociadas a la infección persistente, tanto antes como después de la infección. Esta información se procesó independientemente para los transcritos alterados en cada uno de los sistemas de infección Huh7<sub>pro</sub> o Huh7<sub>DMSO</sub>, si bien los resultados obtenidos se analizaron en su conjunto para identificar aspectos comunes y singulares de cada uno de los sistemas.

Las listas de transcritos que muestran diferencias estadísticamente significativas ( $FDR \leq 0.05$ ) en las diferentes condiciones experimentales independientemente de la magnitud ( $\log_2FC$ ) (Tabla 4.1) se lanzaron frente a las bases de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG-Pathways) (Tabla 4.3), Reactome (Anexos Figura S4.3) y Gene Ontology Biological Process (Anexos Figura S4.4) mediante análisis integrado a través de la plataforma GeneTrail2 (Material y métodos 3.7.3). Los datos obtenidos mediante consulta a la base de datos KEGG-Pathways serán mostrados en el texto y empleados para la discusión de los resultados, mientras que el resto de anotaciones funcionales se recoge en los Anexos Figura S4.3 y S4.4.

KEGG-Pathways es una base de datos centrada en mapas de rutas anotadas manualmente que presenta 280 categorías funcionales asociadas con metabolismo, enfermedades humanas y procesos celulares, entre otras. Cada categoría funcional presenta un p-valor ajustado (Benjamini & Yekutieli 2001) de la relación entre el número de transcritos alterados que se asocian con ella y el número de genes esperado en base a los descritos para esa categoría. En este estudio, el número de transcritos que constituyen una categoría significativamente sobrerrepresentada es de al menos 3 transcritos (**Tabla 4.3**). Desde ahora y en los siguientes apartados, las categorías funcionales significativamente sobrerrepresentadas (p-valor ajustado  $\leq 0.05$ ) serán mencionadas como “**categorías funcionales**”.

**Tabla 4.3**

Sistema de cultivo	Proliferativos (Huh7 <sub>pro</sub> )		Quiescentes (Huh7 <sub>DMSO</sub> )	
	NT <sub>pro</sub> (antes del tratamiento)	TR <sub>pro</sub> (tras la erradicación)	NT <sub>DMSO</sub> (no tratadas)	TR <sub>DMSO</sub> (tratadas)
Número de categorías funcionales	109	23	188	84
Mínimo número de transcritos que constituyen una categoría funcional	4	4	3	4
Máximo número de transcritos que constituyen una categoría funcional	33	9	98	28

Este análisis sugiere que los transcritos alterados por la infección persistente por HCV previo al tratamiento se agrupan en 109 y 188 **categorías funcionales** en las células Huh7<sub>pro</sub> y las Huh7<sub>DMSO</sub>, respectivamente, 98 de las cuales aparecen en ambos sistemas experimentales (**Figura 4.8**) (**Apartado 4.4.1**). No obstante, se han definido 11 categorías funcionales sobrerrepresentadas exclusivamente en Huh7<sub>pro</sub> por la infección persistente por HCV y 90 categorías en Huh7<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.9**) (**Apartado 4.4.2**). Estos datos sugieren que existe un importante solapamiento entre ambos sistemas en la posible significación biológica de las alteraciones transcripcionales observadas durante la infección persistente,

esperable ya que mas de 680 transcritos aparecen regulados por la infección con una magnitud y un sentido comparables (**Figura 4.10A**) (**Apartado 4.5**). Además, muchas de estas categorías funcionales aparecen alteradas en estudios previos de infección aguda por HCV en cultivo celular (Diamond et al. 2010) (Luna et al. 2015) (Lupberger et al. 2019), por lo que además de una validación técnica mediante RT-qPCR (**Figura 4.7**), la inferencia biológica derivada del ORA es coherente entre los dos sistemas y con la literatura previa.

#### 4.4.1. Funciones celulares alteradas por la infección persistente de HCV comunes a cultivos celulares proliferativos y quiescentes

##### 4.4.1.1. Categorías funcionales asociadas a replicación activa del virus que no aparecen sobrerrepresentadas tras la eliminación del virus

De las 98 categorías funcionales asociadas a la infección por HCV en ambos sistemas, 37 no aparecen sobrerrepresentadas tras la eliminación del virus (p-valor ajustado >0.05 en  $TR_{pro}$  y  $TR_{DMSO}$ ) (**Figura 4.8A**). Entre estas categorías funcionales se encuentra “**Hepatitis C**”, sobrerrepresentada por 18 transcritos en las  $NT_{pro}$  y con 23 en las  $NT_{DMSO}$ , y que tras la erradicación del virus únicamente se asocian con esta categoría 2 y 5 transcritos, respectivamente. Entre estos transcritos se encuentra el gen OCLN, correspondiente a la proteína occludin1 descrita en la introducción como uno de los receptores esenciales para la entrada del virus (Ploss et al. 2009) (Apartado 1.2.3) y que ya se ha demostrado regulado a la baja tras la infección por HCV en estudios anteriores (S. Liu et al. 2009).

La infección por HCV induce una alteración de las vías de señalización de proliferación y supervivencia celular (Apartado 1.1.2.3). Entre estas categorías asociadas a la replicación activa del virus y relacionadas con la respuesta de la célula a la infección se encuentran “**NF-kappa B signaling pathway**”, “**Apoptosis**” y “**TNF signaling pathway**” (Park et al. 2012) (Haqshenas et al. 2017). El factor de necrosis tumoral (TNF) juega un papel pivotante en los procesos inflamatorios durante la infección e induce una amplia gama de vías de señal intracelular entre las que se incluyen la apoptosis y la vía de señalización NF-kappa B, por lo que existen transcritos diferencialmente expresados (BIRC3, CHUK, CLFAR, MAP3K14, NFKBIA y RIPK1) que enriquecen las tres categorías.

El ORA permite identificar grupos de transcritos asociados funcionalmente, sin indicar si estas categorías/rutas están activadas. Por ejemplo, la vía de activación del NF-kappa B (factor nuclear-kappa B) puede ser inducida por subproductos de infecciones bacterianas y virales, promoviendo un ambiente proinflamatorio. Sin embargo, durante la infección por HCV la proteína core, junto con otras proteínas virales, inhibe la respuesta mediada por NF-kappa B, intentando evadir la respuesta inmune innata (Joo et al. 2005) (Park et al. 2012). Este equilibrio entre la inducción y represión de la vía ocurre también en la apoptosis (Park



et al. 2012) (Otsuka et al. 2002). En cualquier caso, se ha descrito de manera convincente que la infección por HCV, como en el caso de otras infecciones víricas, conlleva activación de la respuesta mediada por NF- $\kappa$ B (Waris et al. 2002).

Se encuentran también enriquecidas categorías como **“PPAR signaling pathway”** con transcritos como PPAR- $\alpha$ , un regulador central de la homeostasis de triglicéridos que, además de ser un factor esencial para la replicación de HCV (Rakic et al. 2006) (Negro 2009), se ha postulado como factor esencial para el desarrollo de esteatosis hepática y HCC durante la infección crónica por HCV (Dharancy et al. 2005) (Tanaka, Moriya, Kiyosawa, Koike, Gonzalez, et al. 2008) (Tanaka, Moriya, Kiyosawa, Koike & Aoyama 2008). Además, otras categorías funcionales representadas en nuestro estudio asociadas con el metabolismo como **“Glycolysis/Gluconeogenesis”** y **“Pentose Phosphate Pathway”** se han mostrado alteradas también durante la infección por HCV en cultivo celular mediante estudios de proteómica diferencial (Diamond et al. 2012). La alteración de estas categorías funcionales permite re-direccionar la capacidad biosintética de la célula para permitir la replicación de HCV y garantizar la supervivencia de la célula. En conjunto, estos datos refuerzan la capacidad del HCV de alterar el transcriptoma celular con independencia del sistema de cultivo, y a pesar de ello permitir la supervivencia de la célula hospedadora (Vasallo & Gastaminza 2015).

Estas categorías funcionales asociadas únicamente a la replicación activa de HCV no son el principal objeto de estudio de este trabajo, sin embargo, son estas categorías sobrerrepresentadas las que al estar relacionadas con otros trabajos anteriormente publicados, permiten afianzar que nuestros resultados son compatibles con la literatura previa.

#### 4.4.1.2. Categorías funcionales asociadas a replicación activa del virus que permanecen sobrerrepresentadas tras la eliminación del virus

Tras definir las categorías sobrerrepresentadas únicamente durante la replicación de HCV, se analizaron las 12 categorías funcionales asociadas a la infección (p-valor ajustado  $\leq 0.05$  en NT<sub>pro</sub> y NT<sub>DMSO</sub>) que se mantienen significativamente enriquecidas tras la eliminación del virus en ambos sistemas (p-valor ajustado  $\leq 0.05$  en TR<sub>pro</sub> y TR<sub>DMSO</sub>) (**Figura 4.8B**).

Dentro de las categorías relacionadas con el metabolismo se encuentra **“Steroid hormone biosynthesis”**. Las hormonas esteroides derivadas del colesterol son una clase de compuestos biológicamente activos en los vertebrados. La pregnenolona y la progesterona son los materiales de partida para la formación de los tres grupos de esteroides (mineralcorticoides, glucocorticoides y andrógenos). Entre los transcritos alterados que enriquecen esta categoría se incluyen principalmente los que pertenecen a enzimas

biosintéticas esteroides de fase I de la superfamilia de aldo-ceto reductasa (AKR) (Rižner & Penning 2014) (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR1D1,) y a enzimas conjugadoras de fase II de la familia de UDP-glucuronosiltransferasas (UGT) (UGT2B10, UGT2B11, UGT2B4, UGT2B7) (Mackenzie et al. 1992). Entre estos transcritos, UGT2B4 y UGT2B11 se encuentran alterados en ambos sistemas, durante y tras la infección y constituyen unos de los pocos ejemplos de transcritos alterados permanentemente en ambos sistemas, tal y como se detallará en el apartado 4.5.1.2.

**A**

Huh7pro		Huh7DMSO	
NT	TR	NT	TR
<b>Categoría funcional</b>			
<b>Glycolysis / Gluconeogenesis</b>			
Biosynthesis of amino acids			
<b>Hepatitis C</b>			
Carbon metabolism			
<b>TNF signaling pathway</b>			
Fructose and mannose metabolism			
Leukocyte transendothelial migration			
<b>NF-kappa B signaling pathway</b>			
Neurotrophin signaling pathway			
Osteoclast differentiation			
Inositol phosphate metabolism			
<b>PPAR signaling pathway</b>			
Purine metabolism			
<b>Apoptosis</b>			
Calcium signaling pathway			
Jak-STAT signaling pathway			
Pancreatic secretion			
Thyroid hormone synthesis			
Glycine, serine and threonine metabolism			
Biosynthesis of unsaturated fatty acids			
Fc gamma R-mediated phagocytosis			
Vibrio cholerae infection			
Measles			
<b>Pentose phosphate pathway</b>			
Adipocytokine signaling pathway			
Butanoate metabolism			
Circadian entrainment			
Cell adhesion molecules (CAMs)			
ABC transporters			
Epithelial cell signaling in H. pylori infection			
Serotonergic synapse			
Basal cell carcinoma			
Glycosaminoglycan biosynthesis			
One carbon pool by folate			
Legionellosis			
Peroxisome			
Fat digestion and absorption			

**B**

Huh7pro		Huh7DMSO	
NT	TR	NT	TR
<b>Categoría funcional</b>			
<b>Complement and coagulation cascades</b>			
<b>PI3K-Akt signaling pathway</b>			
<b>Pathways in cancer</b>			
Hippo signaling pathway			
Focal adhesion			
Regulation of actin cytoskeleton			
Small cell lung cancer			
<b>Steroid hormone biosynthesis</b>			
Retinol metabolism			
Protein processing in endoplasmic reticulum			
Drug metabolism - cytochrome P450			
ECM-receptor interaction			

**C**

Huh7pro		Huh7DMSO	
NT	TR	NT	TR
<b>Categoría funcional</b>			
<b>Amoebiasis</b>			
<b>Chemical carcinogenesis</b>			
Starch and sucrose metabolism			
Metabolism of xenobiotics by P450			
Phosphatidylinositol signaling system			

**D**

Huh7pro		Huh7DMSO	
NT	TR	NT	TR
<b>Categoría funcional</b>			
<b>Cell cycle</b>			
<b>Proteoglycans in cancer</b>			
HTLV-I infection			
Pathogenic Escherichia coli infection			
MicroRNAs in cancer			
Viral carcinogenesis			
<b>Endocytosis</b>			
TGF-beta signaling pathway			
p53 signaling pathway			
Gap junction			
Herpes simplex infection			
Hepatitis B			
Axon guidance			
Phagosome			
FoxO signaling pathway			
Protein digestion and absorption			
Thyroid hormone signaling pathway			
Rap1 signaling pathway			
Glutathione metabolism			
Lysosome			
Steroid biosynthesis			
Epstein-Barr virus infection			
Alcoholism			
Ras signaling pathway			
Toxoplasmosis			
Insulin signaling pathway			
MAPK signaling pathway			
Transcriptional misregulation in cancer			
Renal cell carcinoma			
Arginine and proline metabolism			
HIF-1 signaling pathway			
Bile secretion			
Influenza A			
Tuberculosis			
Mineral absorption			
Chemokine signaling pathway			
Adrenergic signaling in cardiomyocytes			
ErbB signaling pathway			
Vascular smooth muscle contraction			
T cell receptor signaling pathway			
<b>Tight junction</b>			
Cytokine-cytokine receptor interaction			
Chagas disease (American trypanosomiasis)			
B cell receptor signaling pathway			

**Figura 4.8. Categorías funcionales asociadas a la infección en ambos sistemas.** Los transcritos alterados significativamente entre las células infectadas con HCV y las células control, antes y después del tratamiento con DAAs, que se muestran en la Figura 4.3 (A y B) se sometieron a un análisis de sobrerrepresentación (ORA) utilizando la base de datos KEGG-pathway. Las categorías sobrerrepresentadas estadísticamente significativas se muestran como un mapa de color (blanco/verde, ver escala), con una intensidad inversamente proporcional al valor p obtenido para una categoría dada (-LOG p), con un valor de corte de 1.3 ( $p \leq 0.05$ ). **A)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas significativamente antes del tratamiento en ambos sistemas y que no están sobrerrepresentadas después del tratamiento con DAAs. **B)** Categorías funcionales que permanecen sobrerrepresentadas tras la erradicación del virus en ambos sistemas. **C)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas significativamente antes del tratamiento con DAAs en ambos sistemas, que únicamente se mantienen sobrerrepresentadas tras la erradicación del virus en células proliferativas **D)** Categorías funcionales que se mantienen sobrerrepresentadas tras la erradicación del virus solamente en células quiescentes

Entre los procesos celulares se encuentra sobrerrepresentada de manera permanente la categoría “**Complement and coagulation cascades**”, tanto por transcritos de la cascada del sistema de complemento (C5, CD55, CFH, SERPING1) un mecanismo de defensa inespecífico contra los patógenos (Dunkelberger & Song 2010), como por transcritos relacionados con la cascada de coagulación procoagulantes (F12, F13B, F2, FGA, FGB, FGG) y anticoagulantes (A2M, PROS1, TFP1, PROC, SERPIND1). Entre estos transcritos de la cascada de coagulación está F2 (protrombina), que permite la formación de trombina, y el fibrinógeno soluble (FGA, FGB y FGG), que gracias a la trombina se convierte en fibrina insoluble (Roberts & Cederbaum 1972). Además, dos factores de coagulación (A2M y FGA) se han propuesto como posibles biomarcadores en carcinomas hepatocelulares asociados a la infección por HCV (Ho et al. 2010) (Ferrín et al. 2015). Estos datos sugieren que la infección por HCV altera los niveles de expresión de mensajeros asociados a funciones relacionadas con los sistemas del complemento y de algunos factores de coagulación.

Las categorías “**PI3K-Akt signaling pathway**” y “**Pathways in cancer**” también se encuentran sobrerrepresentadas con varios transcritos (AKT3, BCL2L1, FGF19, JAK1, LAMA3, LAMC2, MYC, PDGFA, PDGFRA) enriqueciendo ambas categorías. “PI3K-Akt signaling pathway” se refiere a una vía de señalización capaz de activarse por diversos estímulos celulares o agentes potencialmente tóxicos, y puede controlar distintos procesos celulares como la apoptosis (BAD, BCL2L1), la síntesis de proteínas o el ciclo celular (CCND1, CDK, RBL2, MYC). Estas categorías están sobrerrepresentadas durante la infección, entre otros motivos, por la activación de la vía de señalización de PI3K mediada por la proteína viral NS5A (Apartado 1.1.2.3), la cual permite la estabilización de  $\beta$ -catenina (Street et al. 2005; Milward et al. 2010), un protooncogen que activa la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. La activación de esta vía durante la infección por el

HCV ha sido descrita anteriormente por estudios previos en modelos de replicón o de infección por el virus (Z. Liu et al. 2012; Shi et al. 2016). No obstante, dado que en muchos casos la activación de esta vía se ha asociado con el estrés inducido por la expresión de proteínas virales, sorprende encontrar sobrerrepresentada esta vía tras la eliminación de los antígenos y RNA viral del cultivo (**Figuras 4.1 y 4.3**). Cabe destacar que estas categorías permanecen sobrerrepresentadas por diferentes transcritos dependiendo del sistema experimental empleado.

En conjunto, estos datos refuerzan la capacidad del HCV de alterar el transcriptoma celular con independencia del sistema de cultivo, y sugieren que las alteraciones transcripcionales observadas durante la infección y tras la erradicación del virus (**Figura 4.6**), se agrupan en categorías funcionales ligadas a la infección por HCV. La mayoría de categorías funcionales únicamente están asociadas a la infección persistente por HCV, pero algunas permanecen sobrerrepresentadas en dos sistemas de cultivo celular distintos a pesar estar virológicamente curadas.

#### 4.4.1.3. Categorías funcionales asociadas a replicación activa del virus sobrerrepresentadas diferencialmente tras la eliminación del virus en Huh7<sub>pro</sub> o Huh7<sub>DMSO</sub>

Después de analizar las categorías funcionales que permanecen irreversiblemente enriquecidas en ambos sistemas, el siguiente objetivo fue comparar las diferencias observadas tras la erradicación del virus entre ambos sistemas de cultivo. De las 98 categorías funcionales asociadas a la infección en ambos sistemas ( $p$ -valor ajustado  $\leq 0.05$  en NT<sub>pro</sub> y NT<sub>DMSO</sub>), existen 5 que se mantienen sobrerrepresentadas tras la erradicación del virus únicamente en Huh7<sub>pro</sub> ( $p$ -valor ajustado  $\leq 0.05$  en TR<sub>pro</sub> y  $> 0.05$  en TR<sub>DMSO</sub>) (**Figura 4.8C**), mientras que en Huh7<sub>DMSO</sub> existen 44 ( $p$ -valor ajustado  $> 0.05$  en TR<sub>pro</sub> y  $\leq 0.05$  en TR<sub>DMSO</sub>) (**Figura 4.8D**).

Entre las 5 categorías funcionales permanentes tras la erradicación del virus en Huh7<sub>pro</sub> aparecen categorías poco informativas (**Figura 4.8C**). Por ejemplo, bajo la categoría funcional “**Amoebiasis**” destaca la presencia de transcritos asociados a respuesta inmunitaria como TFGB1, TGFB2 y IL1R, alterados también por HCV, son los que hacen que aparezca sobrerrepresentada esta categoría. Por otro lado, en la categoría que engloba a la carcinogénesis química se encuentran muchas de las rutas de detoxificación de xenobióticos carcinógenos (Wogan 2000) (Wogan et al. 2004), rutas a las que pertenecen algunos de los transcritos destacados anteriormente en la categoría.

En el caso del sistema Huh7<sub>DMSO</sub>, el alto número de transcritos identificados como alterados resulta en 44 categorías funcionales sobrerrepresentadas (**Figura 4.8D**). Al analizar la naturaleza de las mismas, llama la atención que un número elevado de vías de señalización

alteradas por la infección persistente en ambos modelos y que no aparecen sobrerrepresentadas en el modelo de poblaciones proliferativas, permanecen sobrerrepresentadas en el modelo de infección en células quiescentes. Entre ellas podemos encontrar las vías de señalización de TGFB, FoxO, MAPK, Hippo o HIF1, de forma que parece que la infección no se ha eliminado completamente. Esta noción se refuerza por la sobrerrepresentación de categorías funcionales asociadas con infecciones por patógenos con tendencia a establecer persistencia (Toxoplasmosis, hepatitis B, Epstein-Barr o Herpesvirus), en una nueva homeostasis que permite la viabilidad del hospedador. Estos resultados sugieren que, a pesar de haber eliminado la infección de los cultivos quiescentes, algunos elementos pertenecientes a vías de señalización activadas permanecen tras el tratamiento con DAAs, en ausencia de RNA o proteínas virales.

Además de esta observación general, destaca entre las demás categorías la de “**Cell Cycle**” por su significación estadística ( $p$ -valor ajustado=1e-28) y un número importante de transcritos dentro de esta categoría, que además muestran un perfil de expresión claramente diferenciado como se verá más adelante. A la categoría “**Cell Cycle**” pertenecen todos los transcritos asociados a la progresión del ciclo celular mitótico, incluidos los de la replicación del DNA (fase S), la mitosis (fase M) y las fases G1 y G2, que las separan temporalmente. En las células quiescentes la presencia de DMSO detiene el ciclo celular en fase G0 (Sainz & Chisari 2006) y resulta llamativo que durante la infección estén asociados a esta categoría 59 transcritos diferencialmente expresados entre las Huh7<sub>DMSO</sub> *mock* y HCV, de los cuales 18 se mantienen alterados tras la erradicación del virus (CCNA2, CCNB1, CCNB2, CDC25A, CDC6, CDK1, CDKN2B, CHEK1, GADD45A, MAD2L1, MCM2, MCM4, MCM7, MYC, PCNA, PTTG1, TGFB2, YWHAG). La alteración de estos transcritos entre otros, da lugar a la sobrerrepresentación de otras categorías relacionadas con la desregulación del ciclo celular y el cáncer como “**viral carcinogénesis**” o “**p53 signaling pathway**”.

Varios estudios *in vitro* han demostrado que la infección por HCV altera el ciclo celular (Walters et al. 2009), y sugieren que la infección por HCV detiene el ciclo celular entre las fases G2 y la mitosis (Kannan et al. 2011) en modelos estándar (proliferativos) de infección, tal y como refrendan nuestros datos de sobrerrepresentación en Huh7<sub>pro</sub>, donde “**Cell cycle**” aparece sobrerrepresentado antes del tratamiento. Es posible, que la sincronización del ciclo celular en los cultivos quiescentes permita observar alteraciones permanentes que pasarían desapercibidas en cultivos proliferativos. Esta consideración podría aplicar a otros procesos celulares que aparecen sobrerrepresentados tras el tratamiento únicamente en los cultivos Huh7<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.8D**).

En este apartado, la probabilidad de que la categoría funcional permanezca irreversiblemente sobrerrepresentada tras la erradicación del virus se reduce por las diferencias observadas entre ambos sistemas tras el tratamiento, a pesar de que muchas categorías funcionales son comunes a ambos modelos durante la infección. En conjunto, estos datos sugieren que categorías funcionales asociadas a la infección persistente por HCV, presentan un comportamiento diferencial tras la erradicación de virus, probablemente asociado a las diferencias de proliferación y selección poblacional entre ambos sistemas.

#### 4.4.2. Categorías funcionales sobrerrepresentadas exclusivamente en células proliferativas o quiescentes

Para poder comparar las similitudes y diferencias entre ambos sistemas es necesario analizar también las categorías asociadas a la infección por HCV que exclusivamente están sobrerrepresentadas en uno de los dos sistemas. En concreto, existen 11 categorías funcionales exclusivamente asociadas a la infección persistente por HCV en Huh7<sub>pro</sub> (p-valor ajustado  $\leq 0.05$  en NT<sub>pro</sub> y  $> 0.05$  en NT<sub>DMSO</sub>) y 90 en Huh7<sub>DMSO</sub> (p-valor ajustado  $> 0.05$  en NT<sub>pro</sub> y  $\leq 0.05$  en NT<sub>DMSO</sub>) (**Figura 4.9**).

En Huh7<sub>pro</sub>, 9 de las 11 categorías están sobrerrepresentadas únicamente durante la replicación de HCV (p-valor ajustado  $\leq 0.05$  en NT<sub>pro</sub> y  $> 0.05$  en TR<sub>pro</sub>;  $> 0.05$  en NT<sub>DMSO</sub>) (**Figura 4.9A**). Entre ellas se encuentran las vías de señalización “**NOD-like receptor signaling pathway**” y “**RIG-I-like receptor signaling pathway**”, dos familias específicas de receptores de reconocimiento de diversos patógenos y asociadas a la respuesta inmune en HCV (Kvarnhammar et al. 2011). RIG-I además es uno de los principales receptores de reconocimiento de patógenos celulares de la infección por HCV (H. M. Liu & Gale 2010). Ambas categorías funcionales están sobrerrepresentadas únicamente durante la infección por HCV en Huh7<sub>pro</sub> y se ha validado por RT-qPCR que MXA, un gen inducible por esta vía que se encuentra alterado en células Huh7<sub>pro</sub>, pero no en Huh7<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.7B**). Estos datos coinciden con el hecho de que los cultivos Huh7<sub>DMSO</sub> presentan una menor capacidad de respuesta a estimulación de la vía de respuesta a interferón (Bauhofer et al. 2012).

Por otro lado, como ocurría con las categorías funcionales observadas únicamente en Huh7<sub>pro</sub>, la mayoría de las 90 categorías funcionales sobrerrepresentadas exclusivamente en Huh7<sub>DMSO</sub> están asociadas a la replicación activa de HCV, puesto que 64 categorías no están sobrerrepresentadas tras la erradicación del virus (p-valor ajustado  $> 0.05$  en NT<sub>pro</sub>;  $\leq 0.05$  en NT<sub>DMSO</sub> y  $> 0.05$  en TR<sub>DMSO</sub>) (**Figura 4.9C**).

Entre ellas, se observan categorías asociadas al metabolismo de lípidos como “**Glycerophospholipid metabolism**” y “**Glycerolipid metabolism**”, que sostienen la estrecha relación entre el metabolismo de lípidos y la replicación de HCV (Popescu et al.

También están sobrerrepresentadas únicamente durante la infección por HCV en Huh7<sub>DMSO</sub> las categorías **“Mismatch repair”**, **“Base excision repair”** y **“Nucleotide excision repair”**, que son las vías más importantes para la reparación de daños en una sola cadena



**Figura 4.9. Categorías funcionales sobrerrepresentadas exclusivamente en células proliferativas o en células quiescentes.** Análisis de sobrerrepresentación utilizando la base de datos KEGG-pathway. Las categorías estadísticamente significativas se muestran como un mapa de color (blanco/verde, ver escala), con una intensidad inversamente proporcional al valor p obtenido para una categoría dada (-LOG p-valor), con un valor de corte de 1.3 ( $p \leq 0.05$ ). **A)** Categorías funcionales sobre-representadas únicamente en Huh7<sub>pro</sub> que desaparecen tras la erradicación del virus (9). **B)** Categorías funcionales sobre-representadas únicamente en Huh7<sub>pro</sub> que permanecen tras la erradicación del virus (2). **C)** Categorías funcionales sobre-representadas únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> que desaparecen tras la erradicación de la infección (64) **D)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> que se mantienen tras la erradicación del virus (25).

de DNA. HCV causa daños en el DNA durante la infección y activa los elementos de respuesta al daño, que juegan un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Machida et al. 2004) (Machida et al. 2010) (S. Pal et al. 2010). Estos datos, junto con los analizados en el apartado anterior (4.3.1.2.), sugieren que durante la replicación de HCV las células quiescentes, a pesar de estar en fase G0, podrían existir desajustes de DNA generados por la infección por HCV, que sobrerrepresentan las categorías de reparación de daño del DNA (Mitchell et al. 2017; Nguyen et al. 2018), y que irían ligados a otras publicaciones que sugieren que la infección por HCV inhibe la reparación del daño del DNA (Mitchell et al. 2017) (Nguyen et al. 2018). A pesar de estos cambios transcriptómicos, no se ha podido detectar una acumulación de mutaciones puntuales significativamente mayor en las células infectadas que en las células control (datos no mostrados).

Aunque la mayoría de categorías funcionales están sobrerrepresentadas únicamente durante la replicación activa de HCV, existen 25 categorías que se mantienen sobrerrepresentadas tras la erradicación del virus ( $p$ -valor ajustado  $> 0.05$  en NT<sub>pro</sub>;  $\leq 0.05$  en NT<sub>DMSO</sub> y  $\leq 0.05$  en TR<sub>DMSO</sub>) (**Figura 4.9D**). Entre ellas se encuentran distintos tipos de cancer “**Chronic myeloid leukemia**”, “**Colorectal cancer**” y “**Pancreatic cancer**”. Estas categorías se encuentran enriquecidas durante la replicación de HCV, entre otros, por transcritos asociados a la vía de señalización PI3K-Akt (Apartado 4.3.1.2.), capaz de controlar la apoptosis o el ciclo celular. Tras la erradicación del virus, algunos transcritos (BCL2L1, MYC, NFKBIA, TGFB2, TGFBR1, TGFBR2) continúan enriqueciendo dichas categorías, de los cuales MYC y TGFB2 también se han asociado al carcinoma hepático causado directamente por HCV (Apartado 4.3.1.2) (Hashimoto et al. 2004).

Agrupadas en división celular se sitúan categorías como “**DNA replication**” y “**Oocyte meiosis**”, sobrerrepresentadas únicamente en las Huh7<sub>DMSO</sub>. Tras la erradicación del virus, entre los transcritos que permanecen alterados se encuentran MCM2, MCM4, MCM7 (del inglés, *minichromosome maintenance*) que forman parte del complejo helicasa MCM,



esencial para el inicio la elongación durante la replicación del DNA celular (Bochman & Schwacha 2009).

En resumen, la mayoría de las categorías funcionales sobrerrepresentadas durante la infección solamente en Huh7<sub>DMSO</sub>, dejan de estarlo tras la erradicación del virus. Sin embargo, las categorías funcionales que permanecen alteradas tras la erradicación del virus sugieren que la infección por HCV induce alteraciones permanentes en el ciclo celular (Apartado 4.4.1.3) y en la replicación del DNA, que exclusivamente pueden identificarse en el sistema de infección en las células quiescentes, donde toda su población se encuentra en fase G0 del ciclo celular, al menos antes de la infección por HCV y en un sistema experimental donde no hay selección poblacional que exija a la célula hospedadora que sea capaz de replicar su DNA y proliferar.

La mayor parte de las alteraciones transcriptómicas retornan a niveles normales tras la erradicación de la infección persistente. Sin embargo, el perfil transcriptómico de las células previamente infectadas y curadas, no es idéntico al de las células no infectadas, sugiriendo que existen alteraciones moleculares permanentes tras la eliminación del virus. Estos cambios sugieren una alteración persistente de la homeostasis celular, con claros signos de estrés manifestado por la desregulación de vías de señalización en respuesta a la infección y de alteraciones de vías metabólicas esenciales.

#### **4.5 El análisis de los perfiles individuales de transcritos alterados por la infección por HCV sugiere diversos mecanismos por los que se establecen alteraciones permanentes**

Con el objetivo de identificar diferentes mecanismos subyacentes al establecimiento de los cambios permanentes, se quiso complementar los estudios de sobrerrepresentación descritos anteriormente (Apartado 4.4) con el estudio de conjuntos de transcritos que presentan un perfil de expresión similar en las distintas condiciones experimentales. Si bien los estudios de sobrerrepresentación emplean la significación estadística en base a su anotación funcional, éstos no tienen en cuenta si la abundancia de cada transcrito se reduce o incrementa durante la infección y tras la erradicación del virus. Por otro lado, las mismas categorías funcionales pueden aparecer sobrerrepresentadas por la presencia de diferentes transcritos según la condición experimental, como se ha podido comprobar en la sección anterior, por lo que en los ORA se pierde información valiosa sobre las tendencias de un determinado transcrito o grupo de transcritos que puede revelar información relevante sobre los condicionantes que determinan su alteración. En este apartado, se describe el estudio de los transcritos que presentan tendencias comparables en células infectadas en los dos sistemas experimentales, antes y después del tratamiento.

#### 4.5.1. Existen transcritos ligados a la replicación activa por HCV que se observan en ambos sistemas de cultivo

El objetivo de este estudio fue analizar los perfiles de expresión individuales en las distintas condiciones y sistemas de cultivo, comenzando por los transcritos significativamente alterados a causa de la infección persistente por HCV que se observan en ambos sistemas de cultivo, Huh7<sub>pro</sub> y Huh7<sub>DMSO</sub>.

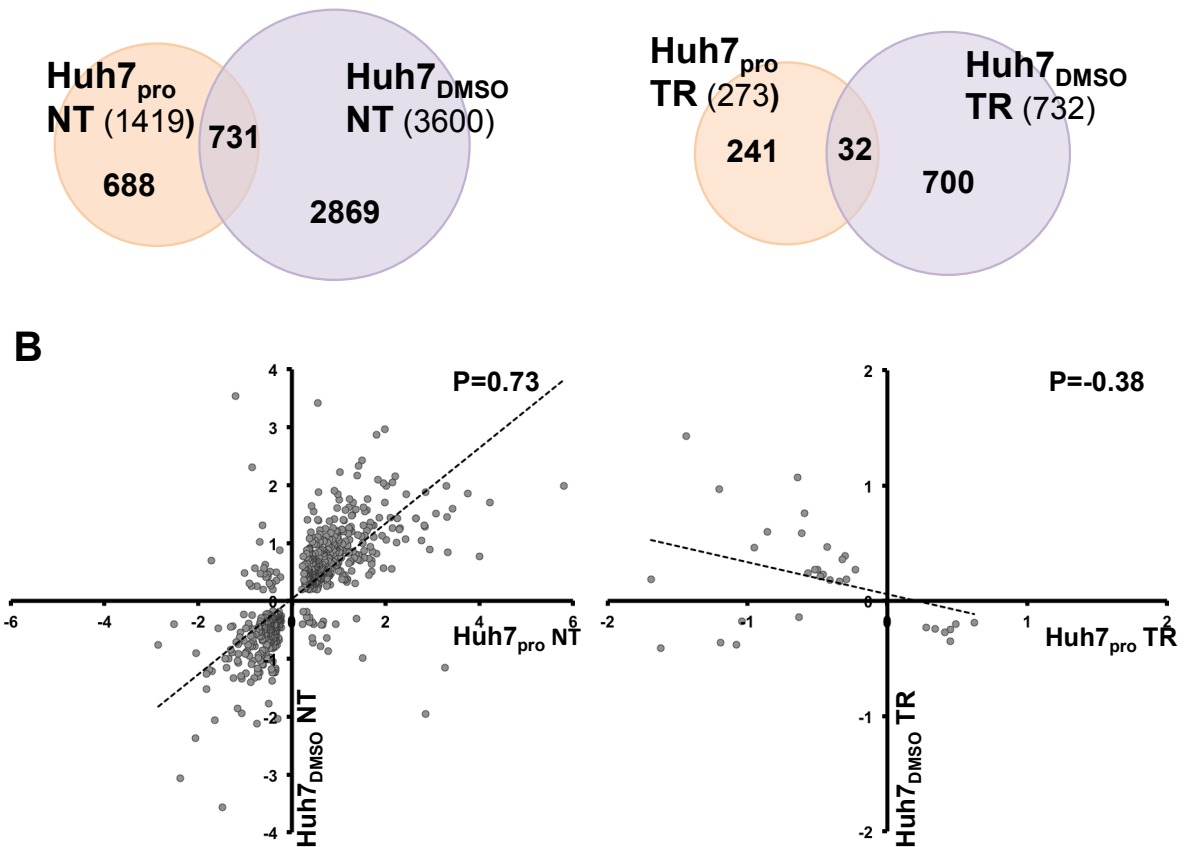
Para ello, de los 1419 y 3600 genes alterados por la replicación activa de HCV en las Huh7<sub>pro</sub> y Huh7<sub>DMSO</sub>, respectivamente, se obtuvieron 731 transcritos significativamente alterados en ambos sistemas ( $FDR \leq 0.05$  en NT<sub>pro</sub> y NT<sub>DMSO</sub>) (**Figura 4.10A**). La expresión diferencial correlaciona con un índice de Pearson de 0.73 entre los dos sistemas, indicando que además de inducir un conjunto de cambios semejantes en los dos sistemas, éstos ocurren con una magnitud ( $\log_2FC$ ) comparable en su mayoría. Esto contrasta con el hecho de que únicamente se observaron 32 transcritos significativamente alterados de manera permanente, de los 273 en las Huh7<sub>pro</sub> y 732 genes Huh7<sub>DMSO</sub> ( $FDR \leq 0.05$  en TR<sub>pro</sub> y TR<sub>DMSO</sub>), y con un coeficiente de correlación de Pearson de -0.38 (**Figura 4.10B**). Estos resultados indican que aunque la infección persistente produce alteraciones transcripcionales similares en ambos sistemas de cultivo, la erradicación del virus deriva en distintas alteraciones permanentes dependiendo del sistema experimental en el que se realiza el estudio.

Por lo tanto, se analizarán en detalle los perfiles transcriptómicos de los 731 transcritos alterados en ambos sistemas de cultivo por la infección persistente por HCV. De estos transcritos alterados en ambos sistemas, 682 transcritos se inducen o reprimen en ambos sistemas y que denominaremos como transcritos que sitúan “en la misma dirección” (M.D). Y por otro lado, 49 transcritos se alteran de manera contraria entre los dos sistemas, que denominaremos como transcritos que se encuentran “en distinta dirección” (D.D), y podrían evidenciar diferencias entre los dos sistemas de cultivo.

**A**

**Células persistentemente infectadas**

**Células virológicamente curadas**



**Figura 4.10** Transcritos ligados a la replicación activa por HCV que comunes a ambos sistemas de cultivo. **A)** Diagramas de Venn que representan el número de transcritos expresados diferencialmente ( $FDR \leq 0.05$ ) por condición y el número de transcritos que se superponen entre las diferentes condiciones. **B)** Coeficiente de correlación de Pearson entre los transcritos significativamente alterados en Huh7<sub>pro</sub> y Huh7<sub>DMSO</sub>, en células persistentemente infectadas o virológicamente curadas.

4.5.1.1. La mayoría de transcritos alterados por la infección por HCV vuelven a su estado basal tras la erradicación del virus

En el ORA (Apartado 4.4) se observó que la mayor parte de las categorías funcionales asociadas a la infección por HCV dejaban de estar sobrerrepresentadas tras la erradicación del virus. Dado que la ausencia de significación estadística no garantiza la ausencia de cambio de magnitud, sino la imposibilidad de rechazar la hipótesis nula, además de no presentar diferencias estadísticamente significativas, ( $FDR > 0.05$ ) se impuso un cambio de magnitud menor de 0.2 ( $FDR > 0.05$ ;  $-0.2 \leq \log_2 FC \leq 0.2$ ) con respecto a las células no infectadas para definir la expresión de un transcrito como “normal”.

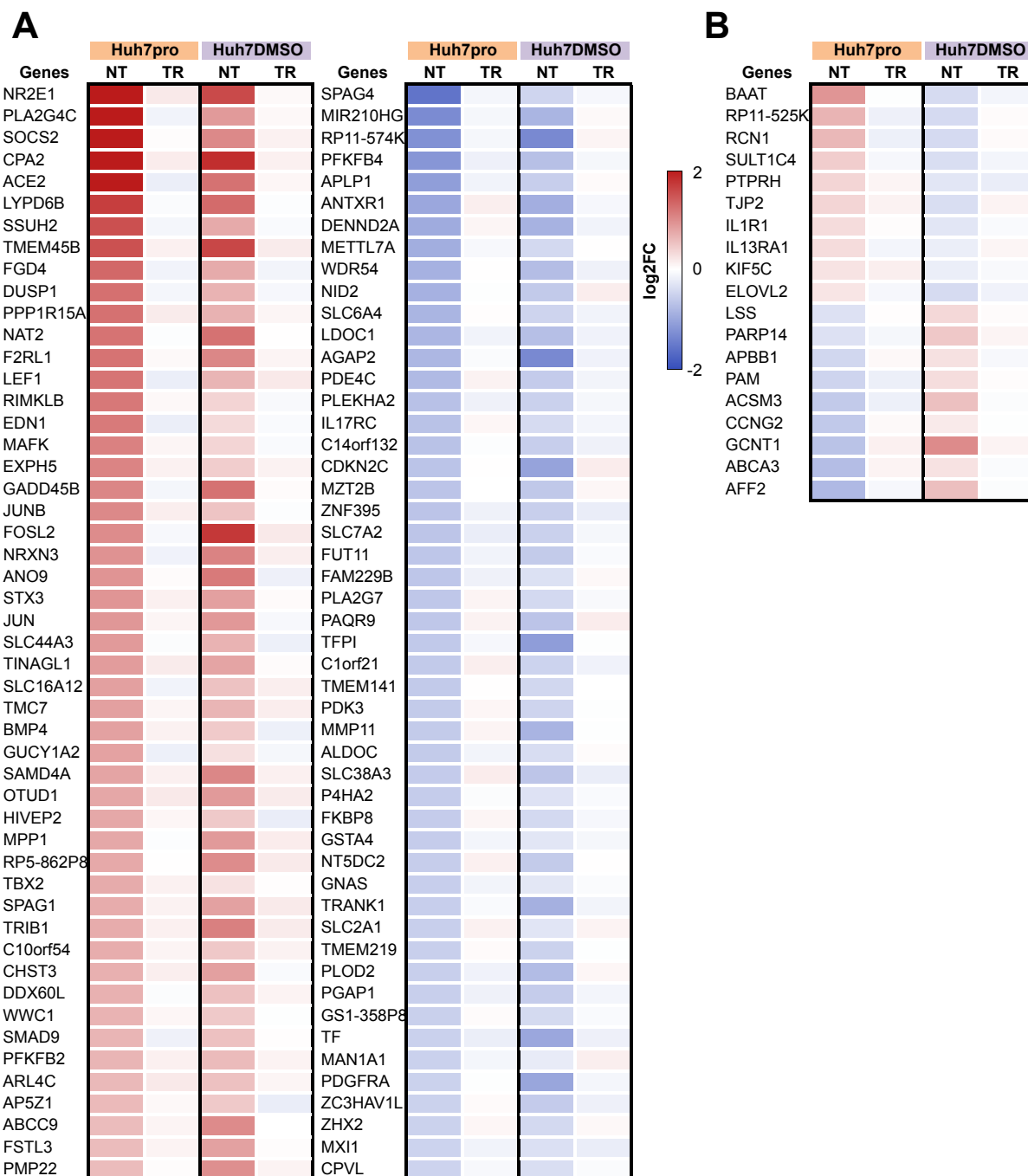
Anteriormente (Apartado 4.3) se mencionó que de los 1419 transcritos diferencialmente expresados antes del tratamiento, 767 (54%) vuelven a niveles normales o bien al finalizar el tratamiento o bien al finalizar el experimento en la células Huh7<sub>pro</sub>. Algo similar ocurre en el sistema de células Huh7<sub>DMSO</sub>, donde de los 3600 transcritos expresados diferencialmente antes del tratamiento, 2690 (74%) vuelven a niveles normales al finalizar el experimento. Estos datos sugieren que los tratamientos con DAAs, además de eliminar el virus de células persistentemente infectadas, promueven la normalización de la expresión de genes alterados por la infección, independientemente del sistema empleado.

Para comenzar el análisis con el conjunto de datos más robustos, empleamos la intersección de los conjuntos de transcritos cuya alteración por la infección correlaciona en NT<sub>pro</sub> y NT<sub>DMSO</sub>. De los 682 transcritos (401 inducidos y 281 reprimidos), 284 transcritos (42%) poseen niveles de expresión normales tras la erradicación del virus en ambos sistemas de cultivo (**Figura 4.11A**). Y analizando después los 49 transcritos alterados en distinta dirección, se observó que 19 de estos transcritos presentan niveles de expresión similares al control tras la erradicación del virus (**Figura 4.11B**). Por lo tanto, se ha podido verificar la normalización de la expresión del 44% de los transcritos alterados por la replicación activa de HCV en los sistemas experimentales de cultivos proliferativos y quiescentes.

Este conjunto de datos incluyen transcritos previamente caracterizados como regulados por la infección por HCV y que reflejan el estado de estrés inducido por la replicación viral. Llama la atención la regulación a la baja de la expresión de transcritos implicados en el metabolismo de lipoproteínas hepáticas como PCSK9, APOB y MTTP, siendo estas dos últimas factores requeridos para la formación de partículas infecciosas de HCV (Gastaminza et al. 2010). Asimismo, entre los transcritos inducidos durante la infección se encuentran los asociados a respuesta a estímulos. Entre ellos se encuentran DDIT3 (CHOP) y PPP1R15A (GADD34) que son dos genes asociados al estrés del ER y a la infección por HCV (Merquiol et al. 2011) (Ríos-Ocampo et al. 2020). Cabe destacar también la regulación reversible de los transcritos correspondientes a JUN, JUNB y JDP2, subunidades del factor de transcripción AP-1, implicado en múltiples procesos celulares, incluida la respuesta a diferentes situaciones de estrés. Estos transcritos sugieren que se activan diferentes mecanismos de supervivencia para hacer frente a la infección y al estrés que esta ocasiona, sin embargo tras el tratamiento con DAAs y la erradicación del virus. todos ellos parecen retornar, lo que sugiere que el estrés celular se reduce.

En conjunto, este análisis sugiere que el transcriptoma celular se altera durante la replicación activa de HCV y que los tratamientos basados en DAAs son capaces de revertir en torno al 42% de los transcritos alterados en ambos sistemas a su estado basal tras la

erradicación del virus, con independencia de que los transcritos tenga un comportamiento en M.D o D.D durante la infección entre los dos sistemas *in vitro*.

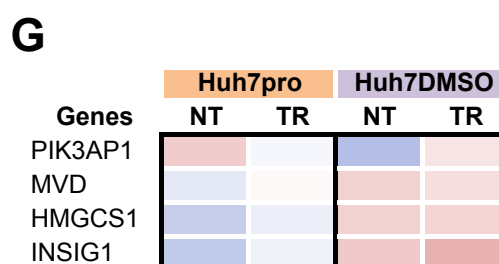
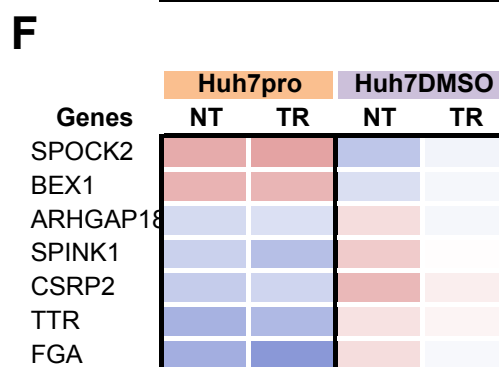
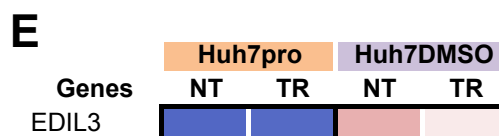
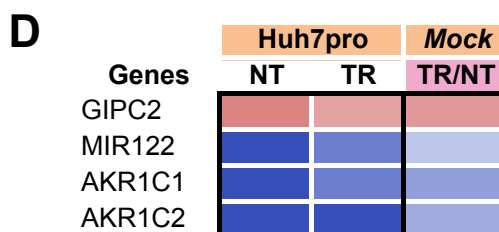
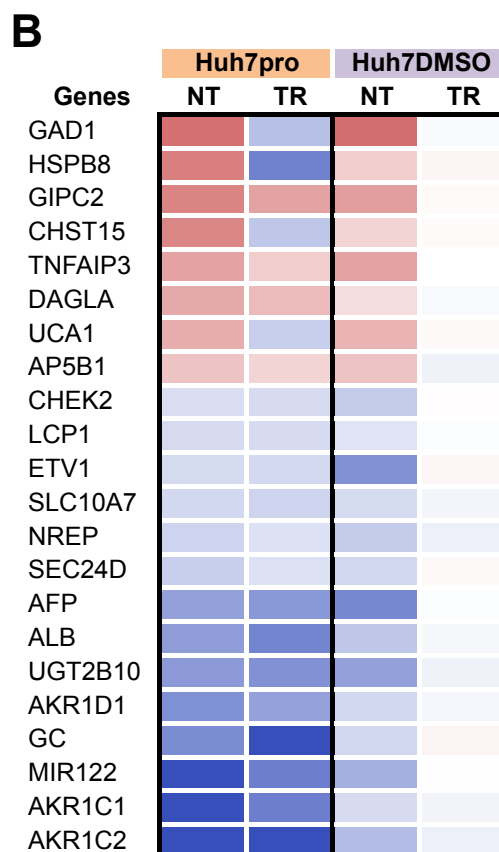
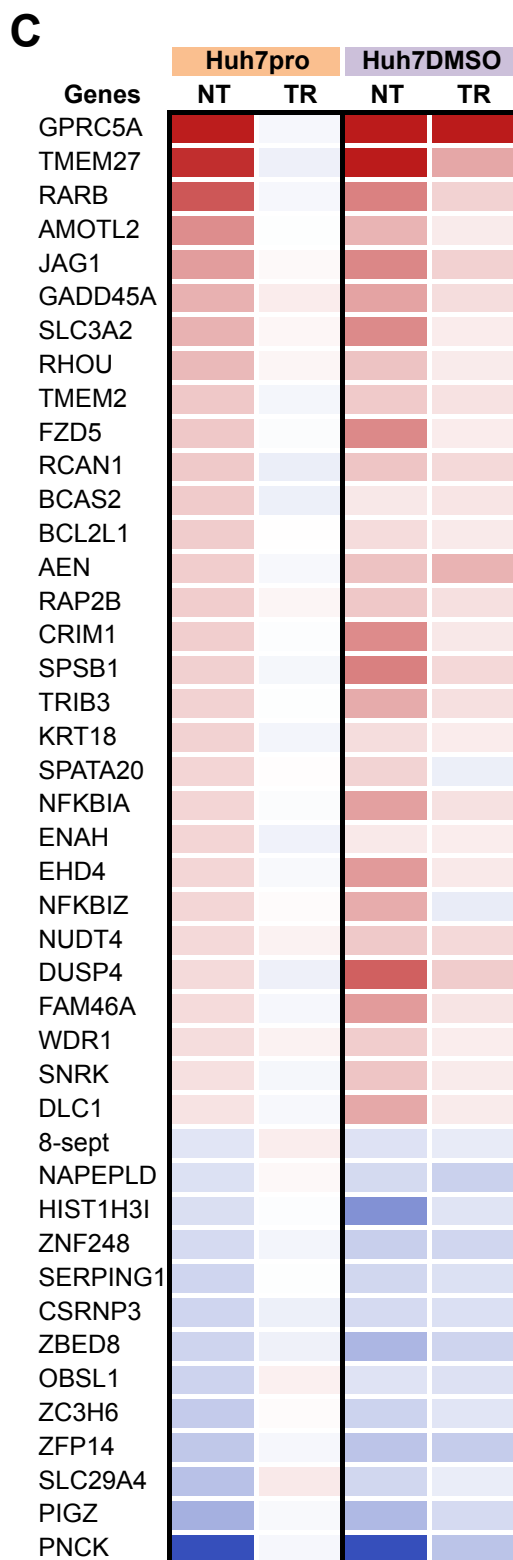
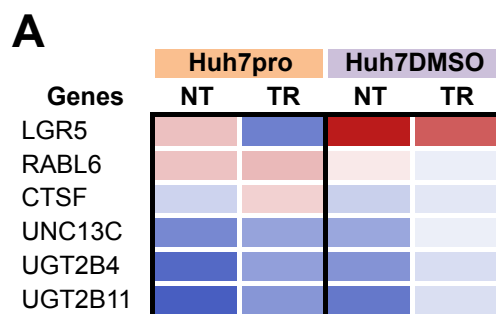


**Figura 4.11 La mayoría de transcritos alterados por la infección por HCV vuelven a su estado basal tras la erradicación del virus. A) Top 100 de los 682 transcritos *alterados* ( $FDR \leq 0.05$ ) en la misma dirección por la infección persistente por HCV en ambos sistemas que vuelven a presentar valores *normales* ( $FDR > 0.05$ ;  $-0.2 < \log_2FC < 0.2$ ) tras la erradicación del virus (50 inducidos + 50 reprimidos). B) 19 transcritos *alterados* por la infección persistente por HCV en distinta dirección en los dos sistemas de cultivo que revierten a niveles de expresión *normales* tras la erradicación del virus**

#### 4.5.1.2. Existen transcritos alterados por la infección por HCV que permanecen permanentemente alterados tras la erradicación del virus

Tras comprobar que cerca del 42% de los transcritos alterados por la infección persistente por HCV vuelven a su estado basal tras la erradicación de HCV, el objetivo fue analizar los transcritos que permanecen alterados a pesar de la erradicación del virus. Para ello, se estudiaron los transcritos alterados por la infección persistente en ambos sistemas de cultivo que se mantienen alterados tras la erradicación del virus, tanto los que se encuentra permanentemente alterados en ambos sistemas de cultivo como los que únicamente lo hacen en Huh7<sub>pro</sub> o Huh7<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.12**).

De los 682 transcritos alterados en ambos sistemas en la misma dirección durante la infección persistente, únicamente 6 transcritos se encuentran permanentemente ralterados tras la eliminación del virus en ambos sistemas de cultivo, (**Figura 4.12A**). Tres se encuentran reprimidos durante la infección persistente y permanecen reprimidos tras la erradicación del virus en ambos sistemas (UNC13C, UGT2B4 y UGT2B11), mientras que los otros tres transcritos (LGR5, RABL6 y CTSF) se encuentran en distinta dirección entre ambos sistemas tras la erradicación del virus.



log2FC

2

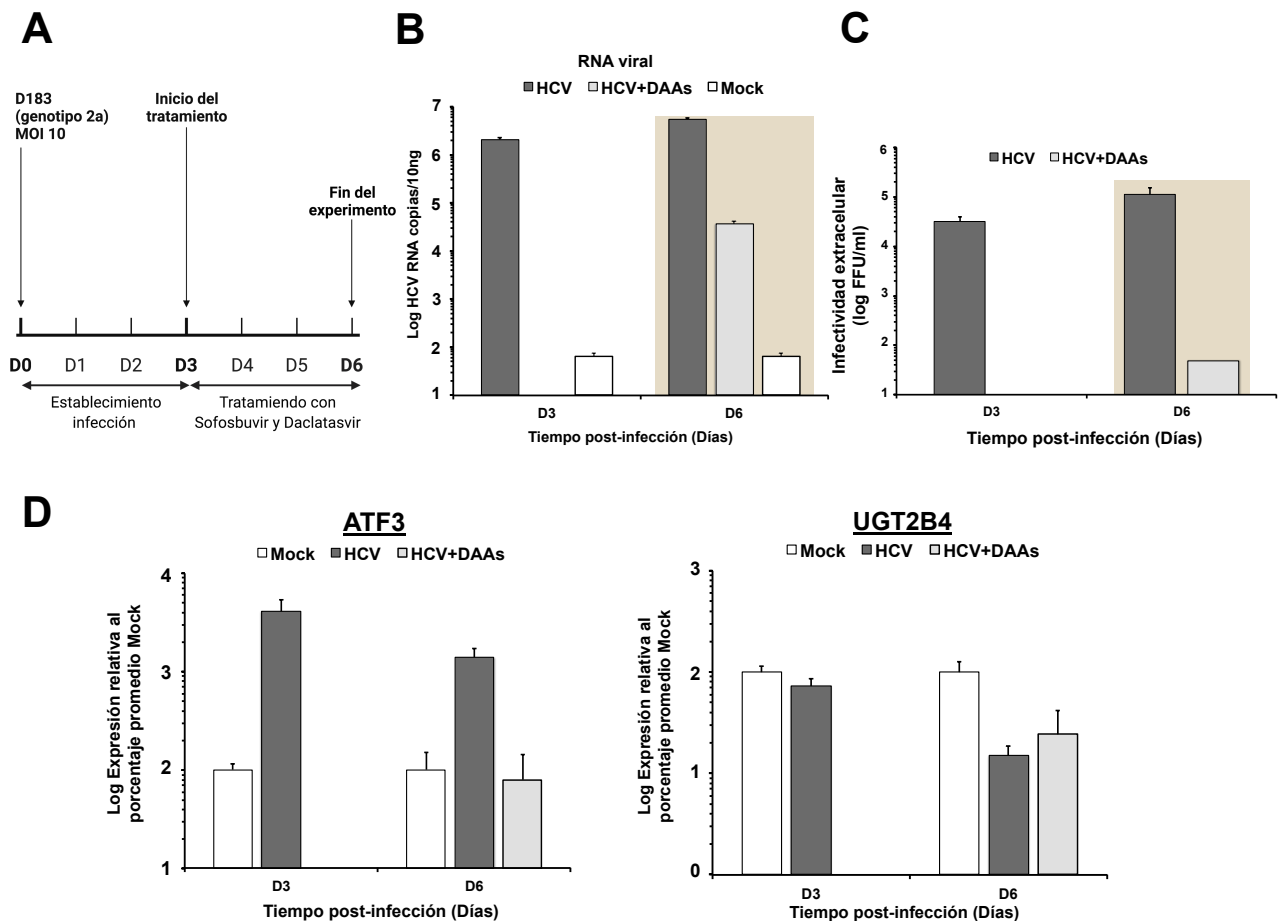
0

-2

**Figura 4.12. Transcritos alterados por la infección por HCV que permanecen permanentemente alterados tras la erradicación del virus.** **A)** Transcritos **alterados** (FDR  $\leq 0.05$ ) en la misma dirección durante la infección y que se encuentran **permanentemente alterados** en ambos sistemas de cultivo. **B) - D)** Transcritos **alterados permanentemente** únicamente en las Huh7<sub>pro</sub>. **C)** Transcritos **alterados permanentemente** únicamente en las Huh7<sub>DMSO</sub>. **E)** 1 transcrito alterado permanentemente en distinta dirección entre los dos sistemas. **F)** Transcritos alterados en distinta dirección entre ambos sistemas que se encuentran **alterados permanentemente** únicamente en las Huh7<sub>pro</sub>. **G)** Transcritos alterados en distinta dirección entre ambos sistemas que se encuentran **alterados permanentemente** únicamente en las Huh7<sub>DMSO</sub>.

UNC13C codifica una proteína implicada en la maduración de las vesículas durante la exocitosis. Mutaciones en este gen se han asociado con la supresión de tumores en biopsias de pacientes con carcinoma de células escamosas (Velmurugan et al. 2019). UGT2B4 y UGT2B11 pertenecen a la familia UDP glucuronosiltransferasa 2, que se encarga de realizar la glucuronidación, un importante mecanismo de detoxificación celular que se realiza principalmente en el hígado (Tukey & Strassburg 2000). Estos datos sugieren que, aunque sea un número muy reducido, existen transcritos permanentemente alterados a causa de la infección persistente por HCV en células virológicamente curadas, con independencia de que las células sean proliferativas o quiescentes. Cabe destacar que durante la validación por RT-qPCR de los datos de RNA-seq, pudimos verificar que FGB presenta una reducción estadísticamente significativa durante la replicación activa del virus (no identificada como significativa por el análisis de RNA-seq en Huh7<sub>DMSO</sub>) y que permanece regulado a la baja significativamente en los dos sistemas experimentales. Dada la baja frecuencia de alteraciones permanentes en ambos sistemas se decidió verificar si la reducción irreversible de UGT2B4 se puede verificar tras una infección aguda por HCV en cultivos proliferativos. Para ello, se inocularon Huh-7 con HCV (D183; MOI 10) para estudiar un único ciclo de infección (**Figura 4.13**). Tras 72 horas, las células fueron tratadas con la combinación de DAAs (SOF1  $\mu$ M, DCV 100nM) durante otras 72 horas. Los niveles de UGT2B4 permanecieron regulados a la baja a pesar del tratamiento antiviral, a diferencia de otros transcritos como ATF3, inducido durante la infección y que vuelve a niveles de expresión similares a las células control. Esto sugiere que, independientemente del sistema experimental, existen alteraciones permanentes en el transcriptoma de la célula infectada por HCV (**Figura 4.13**).





**Figura 4.13. Transcritos alterados durante la infección de ciclo único en células Huh-7.** **A)** Esquema de la infección de ciclo único en células Huh-7 **B)** RNA viral intracelular de HCV medido en las diferentes poblaciones de células mediante RT-qPCR a partir de extracciones de RNA celular total. Los datos se muestran como media y desviación estándar de un experimento realizado por triplicado (n=3). **C)** Título de infectividad extracelular se recogieron los distintos sobrenadantes y se titularon mediante dilución límite e inmunofluorescencia. **D)** Niveles de expresión analizados de los transcritos ATF3 y UGT2B4 mediante RT-qPCR se muestran como valores relativos respecto a las muestras Mock.

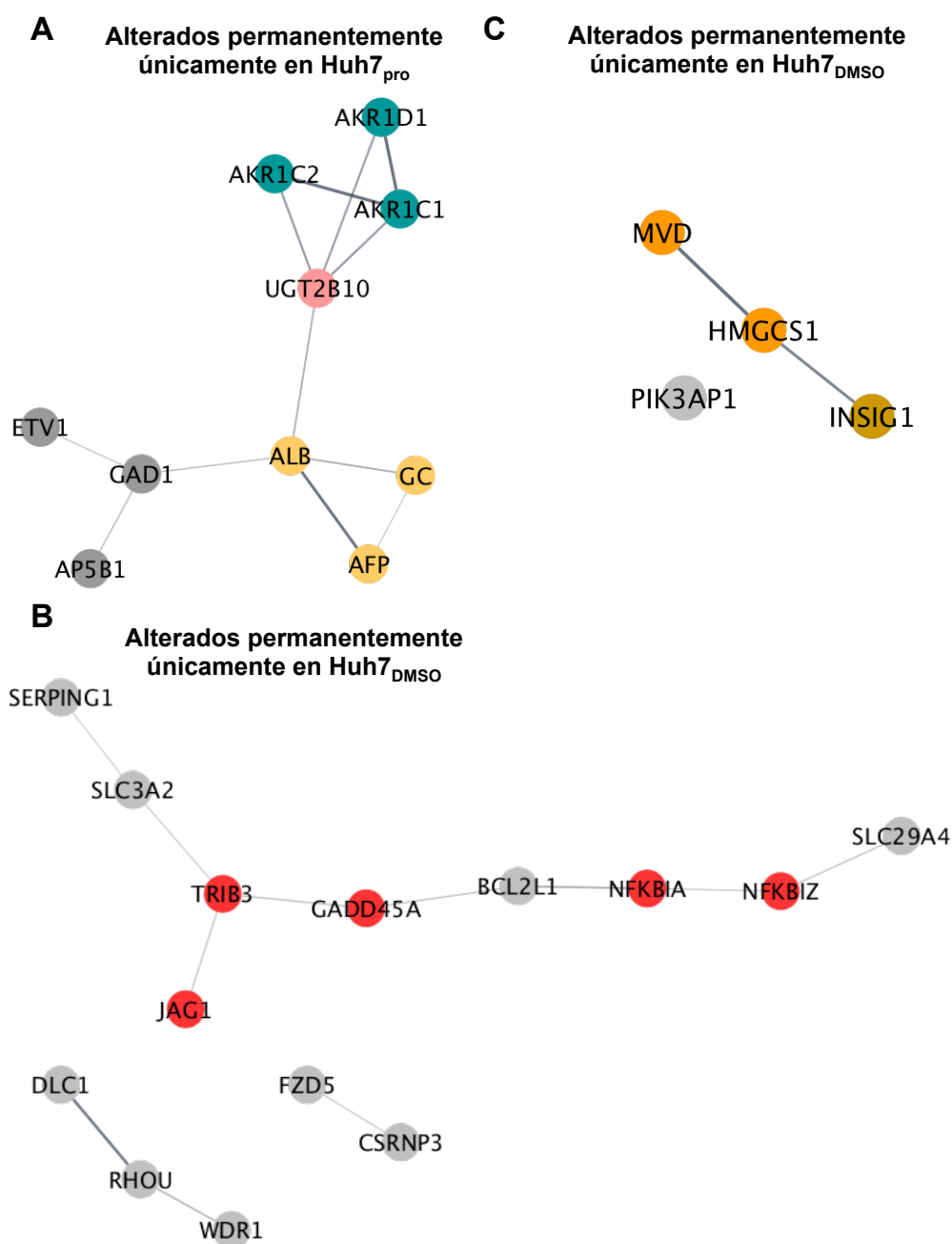
Con respecto a los transcritos alterados en dirección opuesta según el sistema, el comportamiento diferencial tras la erradicación del virus de LGR5, RABL6 y CTSF podría esclarecer aspectos diferenciales entre ambos sistemas. LGR5 es un miembro de la vía de señalización Wnt asociado a HCC (J. Liu et al. 2017) y RABL6 está relacionado con la mejora de la proliferación celular (Y. Feng et al. 2020). Ambos se encuentran inducidos durante la infección por HCV en ambos sistemas. Tras la erradicación del virus en Huh7<sub>pro</sub> se mantiene inducido RABL6 y LGR5 se encuentra con niveles de expresión reducidos respecto a las control, mientras que en Huh7<sub>DMSO</sub> LGR5 se mantiene inducido y RABL6 se reprime (**Figura 4.12A**).

Por otro lado, CTSF es una catepsina que forma parte del sistema proteolítico lisosómico y que en un estudio se ha propuesto su papel como supresor de tumores en cáncer de estomago (Ji et al. 2018). Los niveles de expresión de CTSF se encuentran reprimidos durante la infección por HCV y tras la eliminación del virus en Huh7<sub>pro</sub> se induce, mientras que en Huh7<sub>DMSO</sub> se mantiene reprimido. Estos datos refuerzan el hecho de que parecen existir mecanismos muy diferentes en el establecimiento de alteraciones transcriptómicas permanentes, dependiendo del sistema experimental empleado.

Para comprender mejor estas diferencias, se estudiaron los transcritos que permanecen alterados tras la erradicación del virus únicamente en uno de los dos sistemas de cultivo ( $FDR \leq 0.05$ ), mientras que en el otro vuelven a niveles normales ( $FDR > 0.05$ ;  $-0.2 \leq \log_2 FC \leq 0.2$ ). De los 682 transcritos alterados en la misma dirección en ambos sistemas durante la infección por HCV, existen 22 transcritos permanentemente alterados exclusivamente en las Huh7<sub>pro</sub> (**Figura 4.12B**) mientras que en las Huh7<sub>DMSO</sub> son 43 transcritos (**Figura 4.12C**).

Entre los 22 transcritos en este grupo (**Figura 4.12B**), destaca el hecho de que los transcritos con mayor magnitud de cambio (pri-MIR122, AKR1C1, AKR1C2,) presentan niveles de expresión reducidos (**Figura 4.12D**), una tendencia que se había observado también en las células no infectadas al comparar las células proliferativas antes de empezar el tratamiento y al final del experimento (**Figura 4.5D**). De manera similar, se comporta GIPC2, uno de los pocos transcritos alterados al alza en este sistema tras la eliminación del virus (**Figura 4.12D**). Dado que estos transcritos retornan a niveles normales en Huh7<sub>DMSO</sub> tras el tratamiento, dichas alteraciones permanentes podrían derivarse de una selección poblacional en Huh7<sub>pro</sub>, que parece existir en células no infectadas, y que parece ser reforzada por la infección persistente por HCV.

Entre estos transcritos, cabe destacar la presencia de dos clusters de genes con productos relacionados (**Figura 4.14A**). Por un lado, llama la atención la regulación a la baja de transcritos correspondientes a proteínas producidas por el hígado pero abundantes en el suero como AFP, GC, ALB implicadas en el transporte de iones, ácidos grasos y sales biliares. Con respecto a las sales biliares, también aparece un cluster diferente en el que AKR1C1, AKR1C2 y AKR1D1, implicados en la biosíntesis de esteroides precursores de sales biliares y hormonas esteroideas. También aparece con su expresión reducida UGT2B10, que junto con UGT2B4, también está asociado a la eliminación de sales biliares por glucuronidación.



**Figura 4.14.** Existen transcritos alterados por la infección por HCV que permanecen permanentemente alterados tras la erradicación del virus. **A)** Huh7<sub>pro</sub> – **B)** y **C)** Huh7<sub>DMSO</sub> clusters de transcritos alterados durante la infección en ambos sistemas que se mantienen permanentemente alterados tras la erradicación de la infección. Clusters mostrados utilizando el programa Cytoscape.

En Huh7<sub>DMSO</sub> son 43 transcritos los que se mantienen significativamente alterados tras la erradicación del virus, mientras que vuelven a niveles de expresión normales respecto a las control en Huh7<sub>pro</sub> (**Figura 4.12C**). Entre ellos aparecen varios transcritos relacionados con

la regulación de rutas de las MAPK y la activación de NFkB, como GADD45A, TRIB3 o NFkBIA y NFkBIZ (**Figura 4.14B**). Cabe destacar que la inducción de TRIB3 promueve el carcinoma hepatocelular y se ha propuesto como biomarcador de predicción de mal pronóstico (X.-J. Wang et al. 2020). Además, JAG1, cuya expresión está regulada por TRIB3, aparece permanentemente alterado al alza y se ha relacionado con un mal pronóstico para pacientes de cáncer, incluido el HCC (Xiu et al. 2020). Estos transcritos están alterados durante la infección en ambos sistemas, por lo que se pueden asociar directamente con la replicación activa de HCV. Dichas alteraciones permanentes, observadas exclusivamente en las Huh7<sub>DMSO</sub>, podrían originarse por la incapacidad de las células de revertir los cambios generados por la infección a pesar de erradicar la infección. La ausencia de estos cambios permanentes en células Huh7<sub>pro</sub> curadas podría ser atribuible a una contraselección de subpoblaciones celulares que las presentan o de un “borrado” de las marcas epigenéticas establecidas a lo largo de varias generaciones de células progenie tras la eliminación del virus, tal y como se discutirá más adelante.

Después de analizar los transcritos alterados en la misma dirección, se analizaron los 49 transcritos alterados en ambos sistemas que van en distinta dirección ( $FDR \leq 0.05$  en NT<sub>pro</sub> y NT<sub>DMSO</sub>). En este análisis se observó únicamente 1 transcrito (EDIL3) permanentemente alterado en ambos sistemas tras la erradicación del virus (**Figura 4.12E**). EDIL3 es un regulador de la transición epitelio-mesénquima (EMT), que contribuye a la metástasis y recurrencia de HCC (M.-X. Feng et al. 2014). Este transcrito se mantiene tras la erradicación del virus como se encontraba en cada sistema durante la infección por HCV, reprimido en las Huh7<sub>pro</sub> e inducido en las Huh7<sub>DMSO</sub>, lo que sugiere de nuevo que en células quiescentes, a pesar de estar en fase G0 del ciclo celular, la infección por HCV induce signos de proliferación en comparación con las células quiescentes control.

Por otro lado, existen 7 transcritos que se mantienen significativamente alterados tras la erradicación del virus en Huh7<sub>pro</sub>, mientras que en las células quiescentes vuelven a niveles de expresión basal (**Figura 4.12F**). Entre estos 7 transcritos no se encuentra una clara relación descrita entre ellos, aunque cabe destacar que FGA, validado por RT-qPCR (**Figura 4.7B**), se ha propuesto como biomarcador para la detección de daño hepático puesto que sus niveles se reducen en sueros de pacientes con fibrosis hepática relacionada con HCV (Sogawa et al. 2013).

El caso contrario ocurre en 4 transcritos que se mantienen significativamente inducidos tras la erradicación del virus únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.12G**). PIK3AP1, un gen asociado con cirrosis hepática familiar (Abby Philips et al. 2019), aparece desregulado de manera permanente y contribuye a la sobrerrepresentación de la categoría funcional PI3K-Akt signaling en las Huh7<sub>DMSO</sub>. Entre los transcritos con este perfil, cabe destacar la

regulación al alza de tres genes implicados en la síntesis de colesterol (HMGCS1 y MVD) y su regulación (INSIG1) (**Figura 4.14C**). Curiosamente, estos tres transcritos presentan una regulación a la baja en células Huh7<sub>pro</sub> persistentemente infectadas. Estos datos sugieren que la infección por HCV podría alterar ciertos aspectos del metabolismo del colesterol de manera irreversible en células Huh7<sub>DMSO</sub>. Esta observación viene reforzada por el hecho de que otros transcritos relacionados con el metabolismo de colesterol (SQLE, ACAT2, STARD4, EBP, SC5D, FDPS y SCAP) están significativamente alterados en células Huh7<sub>DMSO</sub> curadas, a pesar de no estar regulados durante la infección persistente, y a pesar de una magnitud de cambio marginal en muchos casos, pero que sugiere una readaptación de la homeostasis relativa a este aspecto del metabolismo de lípidos tras la eliminación de la infección en Huh7<sub>DMSO</sub> (datos no mostrado).

#### 4.5.2. Existen transcritos alterados por la infección HCV que únicamente se observan en uno de los dos sistemas de cultivo

Para discernir mejor las diferencias entre las células proliferativas y quiescentes durante la infección persistente y poder caracterizar así los dos sistemas de cultivo celular, se estudiaron los transcritos que únicamente se encuentran significativamente alterados por la infección por HCV en uno de los dos sistemas de infección ( $FDR \leq 0.05$ ), mientras que en el otro se encuentran no significativos, sin tener en cuenta si sus niveles de expresión son similares a las células control ( $FDR > 0.05$ ;). En concreto, 688 transcritos se encuentran alterados por la infección persistente exclusivamente en Huh7<sub>pro</sub> y 2869 transcritos en Huh7<sub>DMSO</sub>.

##### 4.5.2.1. Transcritos alterados por la infección HCV en Huh7<sub>pro</sub>

De los 1419 genes alterados por la replicación activa de HCV en las Huh7<sub>pro</sub> ( $FDR \leq 0.05$ ), existen 688 transcritos que se encuentran alterados por la infección persistente, mientras que en las células quiescentes presentan niveles de expresión normales ( $FDR > 0.05$ ).

Más de la mitad de estos transcritos alterados (355 transcritos) presentan unos niveles de expresión basales respecto a las control tras la erradicación del virus (**Figura 4.15A**). Cabe destacar que aparecen regulados al alza y de manera reversible por DAAs un conjunto de transcritos relacionados con la biogénesis de ribosomas (UTP20, AATF, ERF, IMP4, TSR1, RPP40, METTL1, CD3EAP, GPATCH4, PES1, NIP7, DDX21, DDX27).

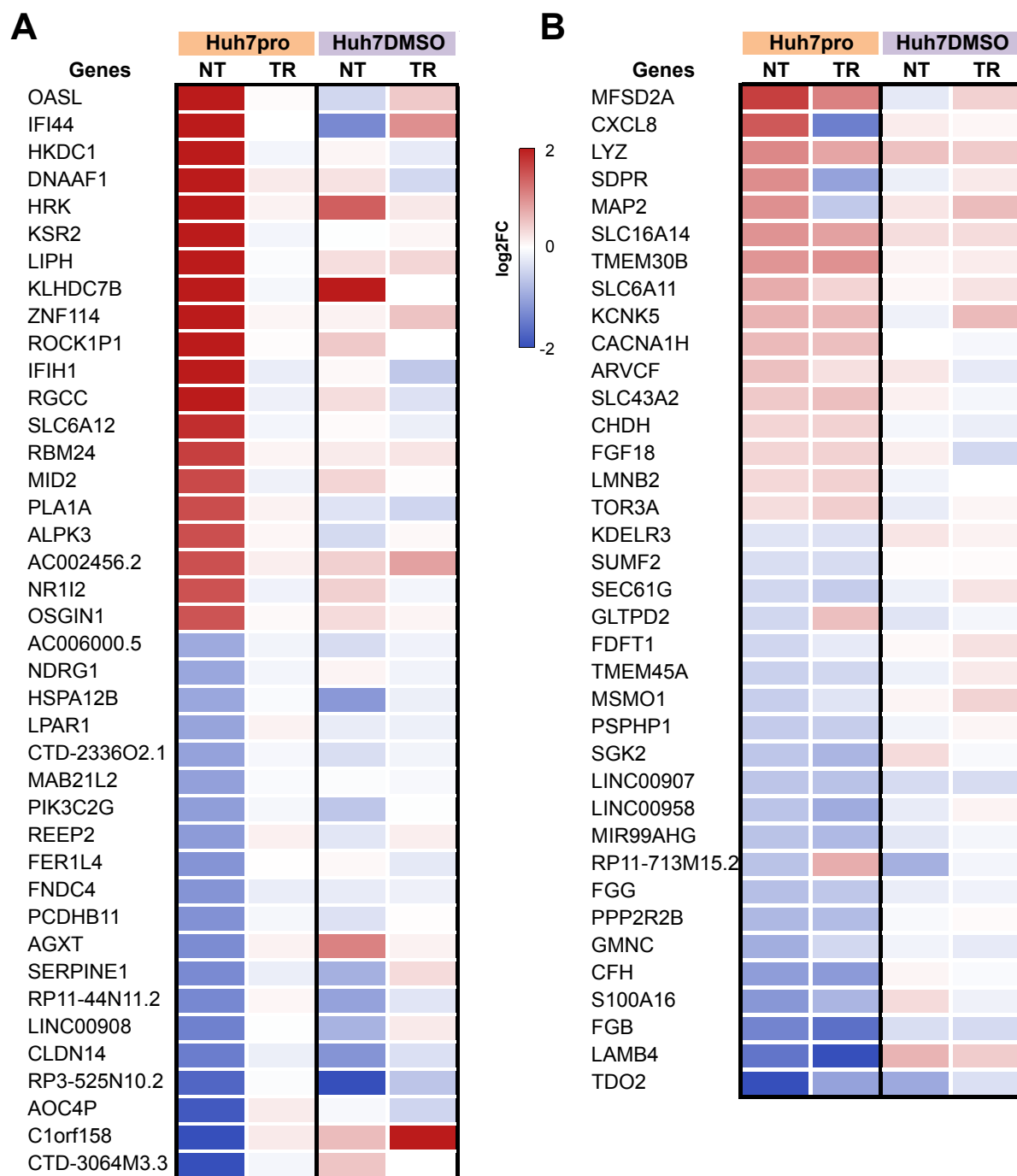
Además, y como se ha visto en las categorías funcionales, la respuesta innata antiviral dependiente de RIG-I y NOD-like receptors (MX1, TRIM26, ISG15, OASL, IFI44, IRF1, IRAK2, NFKBIB, BIRC3, RIPK1) frente a HCV se encuentran reguladas al alza en células Huh7<sub>pro</sub> mientras que no aparecen alteradas en células Huh7<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.15A**). Esto no

se debe a la MOI empleada ni al virus, ya que en ensayo de ciclo único MX1 se induce notablemente en Huh7<sub>pro</sub>. Por lo que es posible que las células Huh7<sub>DMSO</sub>, produzcan una respuesta poco eficaz o limitada en el tiempo, algo ya sugerido previamente por Bauhofer et al. (Bauhofer et al. 2012).

Respecto a los transcritos permanentemente alterados asociados a la infección, aparecen 37 transcritos (5,7%) alterados por la infección persistente por HCV se mantienen alterados a pesar de la erradicación del virus (**Figura 4.15B**). Éstos incluyen diversos transcritos que no parecen agruparse en ninguna unidad funcional concreta, si bien aparecen miembros de categorías funcionales como “Complement and Coagulation cascades” que serán discutidas más adelante.

Por otro lado, cabe destacar FDFT1 y MSMO1, puesto que ambos son reguladores en la vía de biosíntesis del colesterol y se encuentran reprimidos durante la infección, como se había descrito previamente en células infectadas con el genotipo 2a (JFH-1) (P. Xu et al. 2016). Sorprendentemente, FDFT1 y MSMO1, a pesar de no estar alterados por la infección en Huh7<sub>DMSO</sub>, se encuentran diferencialmente regulados al alza en células quiescentes tras la erradicación de HCV, tal y como hemos señalado anteriormente.

Estos datos refuerzan la noción de que la infección por HCV en células proliferativas altera permanentemente transcritos relacionados con la biosíntesis de esteroides y con el sistema del complemento y coagulación, los cuales no vuelven a su estado basal en células virológicamente curadas.



**Figura 4.15** Transcritos alterados por la infección HCV que se observan exclusivamente en Huh7<sub>pro</sub> **A)** Alterados únicamente durante la infección. Representación con los 20 transcritos con el mayor o el menor log<sub>2</sub>FC **B)** 37 transcritos **alterados permanentemente** asociados a la infección por HCV.

#### 4.5.2.2. Transcritos alterados por la infección HCV únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub>

Finalmente, se analizaron los transcritos alterados por la infección HCV que exclusivamente se observan en células quiescentes. De los 3600 genes alterados por la replicación activa de HCV en las Huh7<sub>DMSO</sub> (FDR≤0.05), 2869 transcritos no presentan diferencias

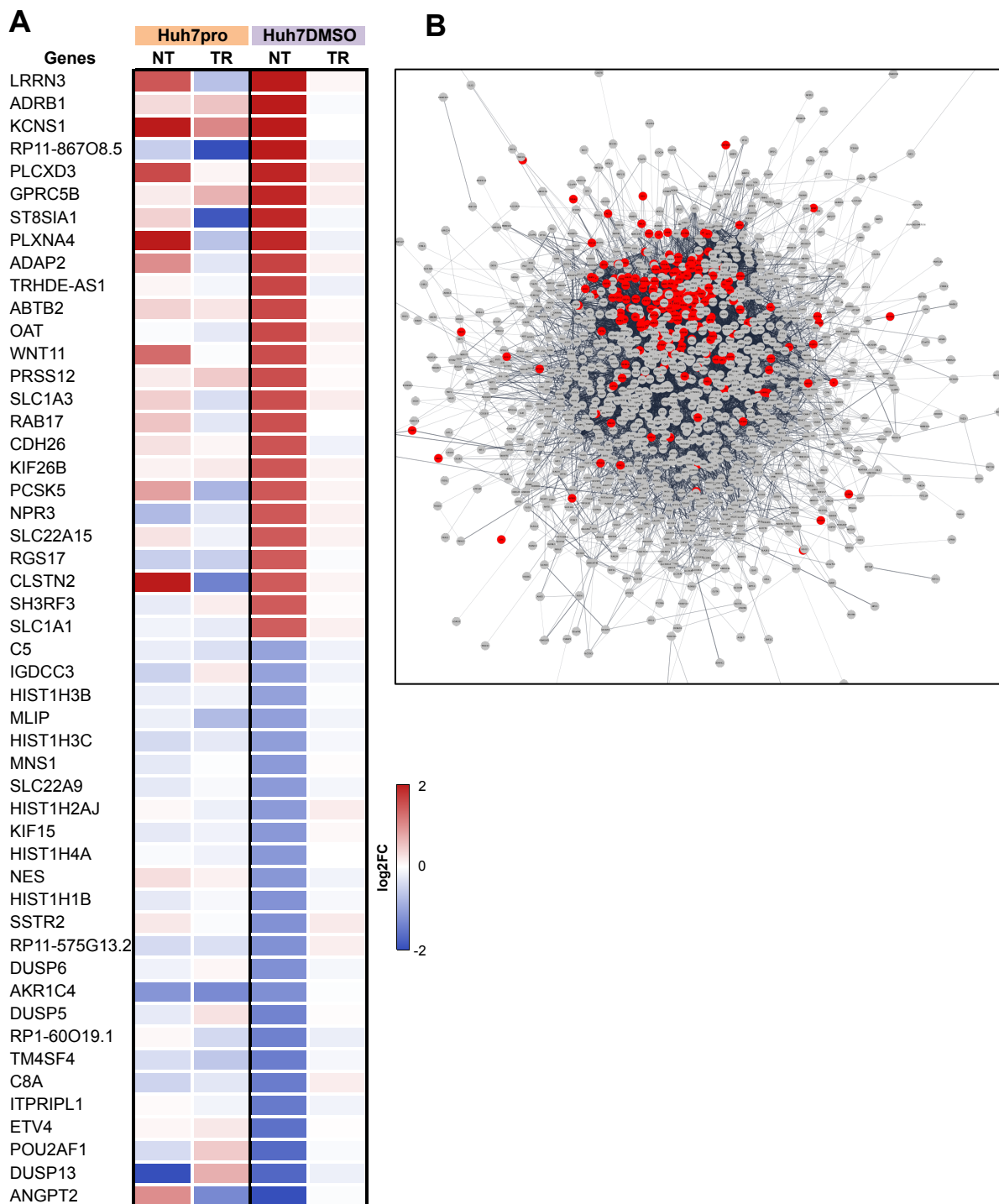
significativas en sus niveles de expresión en las Huh7<sub>pro</sub> (FDR>0.05), indicando grandes diferencias entre ambos sistemas.

El 76% de estos transcritos (2188 transcritos) alterados significativamente por la infección, vuelven a su estado basal respecto a las control tras la erradicación del virus (**Figura 4.16A**). En las Huh7<sub>DMSO</sub> se ha observado la alteración reversible de otros genes de la respuesta innata frente a virus (STAT1, IFIT5, IFI6) que no aparecen regulados en Huh7<sub>pro</sub>, sugiriendo que, aunque existen transcritos comunes relacionados con la respuesta antiviral reversiblemente alterados por la infección persistente (JAK1), existen particularidades según el sistema experimental de cómo se efectúa la respuesta antiviral.

Existe un hecho muy llamativo al analizar aspectos funcionales entre los transcritos alterados de manera reversible y exclusivamente por la infección Huh7<sub>DMSO</sub>. Entre estos transcritos más de 600 genes están asociados con funciones nucleares como la replicación y reparación del DNA, el splicing del mRNA, la modificación de histonas, proteínas del poro nuclear, elementos asociados con mitosis, etc... que no aparecen representados en las células Huh7<sub>pro</sub> (**Figura 4.16B**). Lo más destacable de este fenómeno, es que la mayor parte de los transcritos asociados a funciones nucleares, entre ellos 28 transcritos de diferentes histonas, están regulados a la baja de manera reversible por tratamiento con DAAs, lo cual demuestra que la replicación activa de HCV, exclusivamente citosólica, tiene un impacto global importante sobre diferentes procesos que tienen lugar en el núcleo y que no se han descrito anteriormente a esta escala, dado que la mayor parte de los estudios de transcriptómica diferencial se han realizado en sistemas experimentales similares a Huh7<sub>pro</sub>. Estos resultados sugieren que el estudio de la infección persistente en células quiescentes abre una nueva área de investigación sobre el impacto de HCV en la regulación de procesos nucleares, entre los que, como veremos más adelante, algunos podrían quedar permanentemente alterados tras la eliminación del virus.

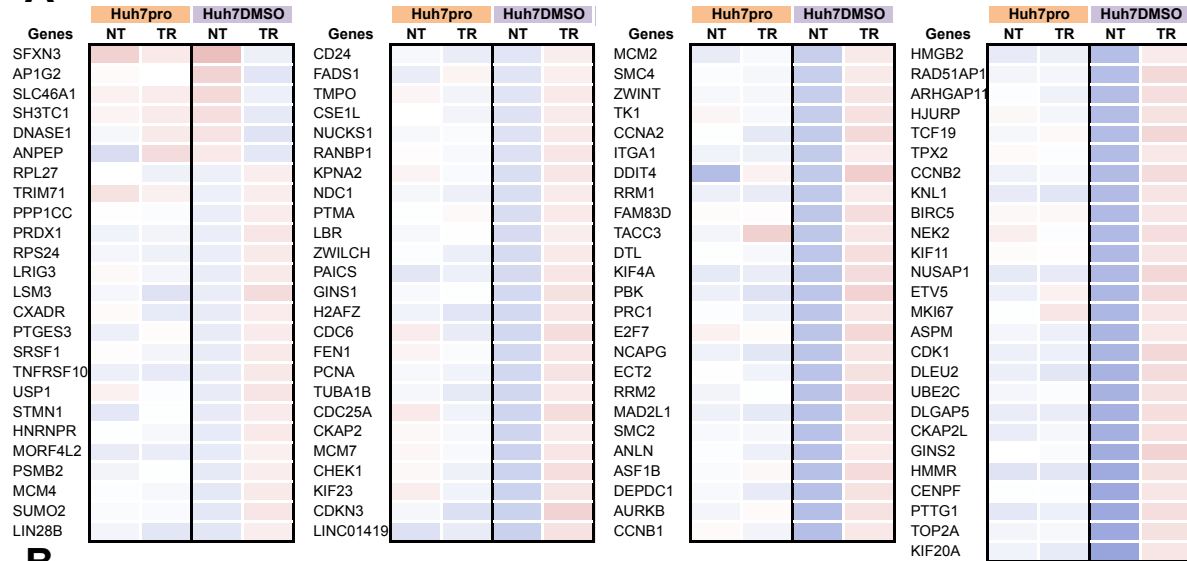
Aunque el 76% de los transcritos alterados únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> presentan niveles de expresión basales tras la erradicación del virus, existen 294 transcritos (un 10% de estos transcritos) ligados a la infección persistente por HCV se mantienen alterados en células virológicamente curadas. En la misma dirección se mantienen 193 transcritos (**Figura 4.17B**), con independencia de la magnitud de cambio, y 101 transcritos se inducen o reprimen tras la erradicación del virus de manera contraria a como se encontraban durante la infección (**Figura 4.17A**).



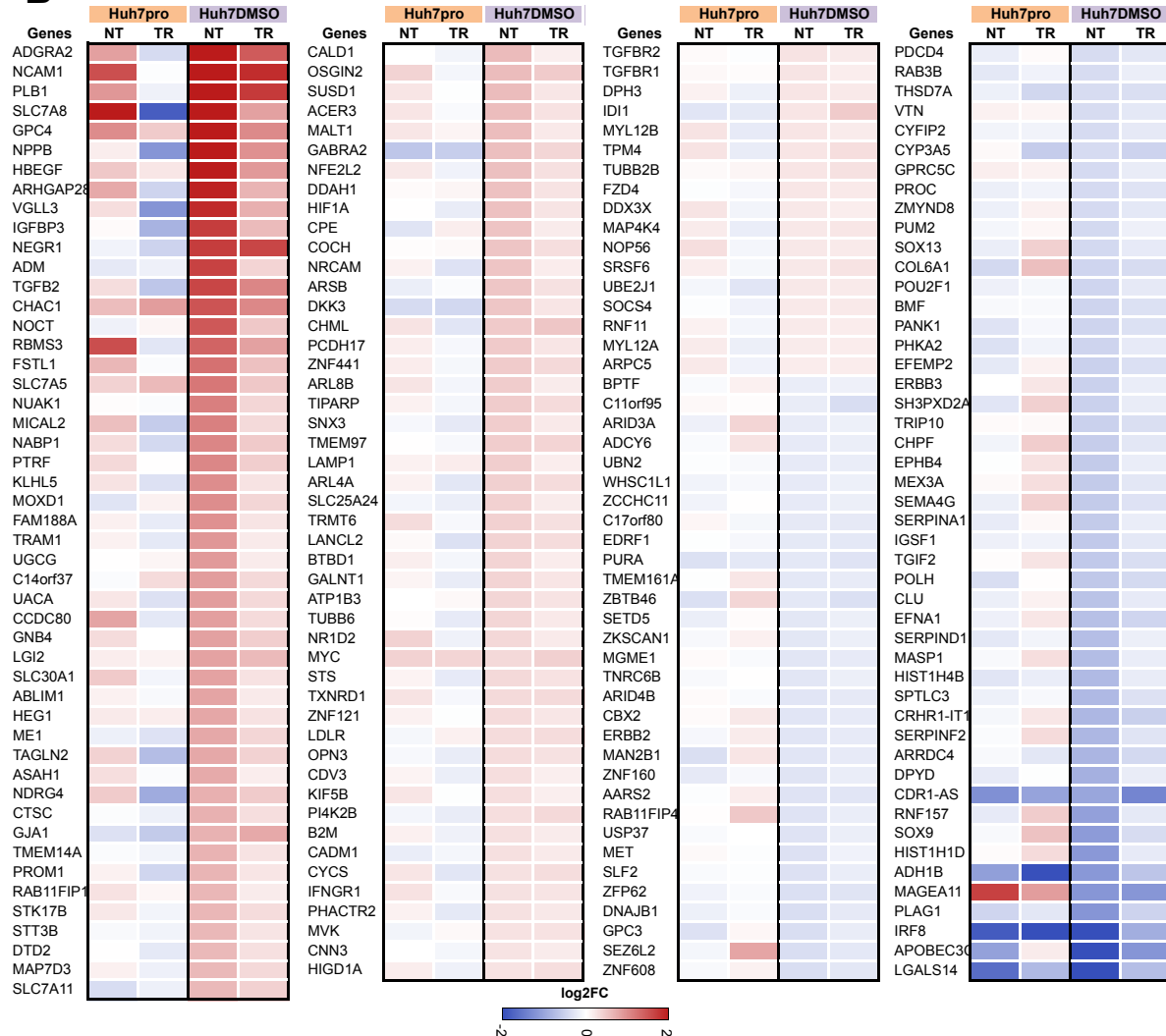


**Figura 4.16. Transcritos alterados por la infección HCV que se observan exclusivamente en Huh7<sub>DMSO</sub>** **A)** Alterados únicamente durante la infección. Representación con los 25 transcritos con el mayor o el menor log2FC **B)** Cytoscape con los 2188 transcritos alterados durante la infección, que son normales tras la erradicación del virus. En Rojo se encuentran marcados aquellos transcritos asociados con el ciclo celular.

**A**



**B**



**Figura 4.17. Transcritos alterados permanentemente por la infección HCV que se observan exclusivamente en Huh7<sub>DMSO</sub>** **A)** 193 transcritos que mantienen su expresión en la misma dirección tras la erradicación del virus. **B)** 101 transcritos que modifican su expresión tras la erradicación del virus pasando a estar en distinta dirección respecto a sus niveles de expresión durante la infección persistente.

Dentro del subconjunto de 101 transcritos alterados permanentemente (**Figura 4.17A**), resulta muy llamativo que, a pesar de presentar magnitudes de cambio al límite de la detección, muchos de estos transcritos se agrupan de manera robusta alrededor de un clúster de genes funcionalmente asociados a mitosis y replicación del DNA que permanece desregulado a la baja durante la replicación y aparece inducido tras la eliminación (**Figura 4.18A**). Estos datos sugieren que, una vez eliminada la replicación activa del virus y su impacto negativo sobre los genes implicados en estos procesos nucleares, algunas funciones sobre el ciclo celular podrían no solo revertir sino que ser sobrecompensadas de alguna manera tras la erradicación del virus.

Además de los transcritos relacionados con el ciclo celular anteriormente mencionados, los cultivos Huh7<sub>DMSO</sub> presentan alteraciones permanentes que se manifiestan en la misma dirección que en la que se encontraban durante la replicación activa de HCV (**Figura 4.17B**). Entre ellos, llama la atención un conjunto de transcritos relacionados con la señalización a partir de TGFB (TGFB2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, TGFB1, TGFB2) (**Figura 4.18B**). Estos datos, junto con los datos de ORA, sugieren que la vía de señalización de TGFB podría permanecer activa en células Huh7<sub>DMSO</sub> curadas. Dado que este hecho coincide con una regulación al alza de genes implicados en la replicación del DNA, consideramos la posibilidad de que la expresión persistente de TGFB2 resultara en una transición epitelio-mesenquimal de los cultivos quiescentes persistentemente infectados, de manera que transcritos de genes implicados en EMT, podrían estar permanentemente alterados. Empleando la categoría EMT de Gene Ontology y gracias a la literatura acumulada alrededor del papel de TGFB en EMT hepática, construimos una lista de genes candidatos para sostener la hipótesis mencionada anteriormente. En la Figura 4.18B se muestra cómo aparecen permanentemente regulados al alza TGFB2, TGBR1, TGBR2, PRSS23, NCAM1, ERBB4, JAG1, LGR5, HIF1A, MKI67, DKK3, ZEB2, NLE2F2, TK1 mientras que los transcritos PDCD4, SOX9 y EFNA1 se encuentran regulados permanentemente a la baja en células Huh7<sub>DMSO</sub> tras la eliminación de la infección. Estos datos sugieren que las células curadas presentan alteraciones transcriptómicas de genes relacionados con EMT, antes y después del tratamiento con DAAs.

Dadas las implicaciones biológicas de estos hallazgos, se validaron algunos de los candidatos mediante RT-qPCR empleando para ello muestras de RNA de dos experimentos independientes, para comprobar la robustez de la observación entre experimentos (**Figura 4.7D**).



#### 4.5.3. Existen transcritos que no codifican proteínas (ncRNAs) alterados permanentemente por la infección HCV

Para determinar si la infección persistente por HCV altera la expresión de RNAs no codificantes, se determinó la expresión diferencial de dichos transcritos, antes y después de la eliminación del virus mediante tratamiento con DAAs en los modelos de infección en poblaciones proliferativas y en células quiescentes.

De los aproximadamente 1500 transcritos no codificantes (ncRNAs) expresados en las células control Huh7 (Materiales y Métodos XX), 19 transcritos están alterados en ambos sistemas de cultivo celular durante la replicación activa de HCV. De los 19 transcritos (**Figura 4.19A**), todos ellos, excepto RP11-525K10.3, se encuentran inducidos o reprimidos en la misma dirección en ambos sistemas (Pearson's  $r=0.8756$ ). Ninguno de estos transcritos permanece alterado en los dos sistemas de cultivo tras la erradicación del virus. Sin embargo, cabe destacar LINC00511 y MIR22HG cuya expresión se induce por la infección y que permanecen alterados en Huh7<sub>DMSO</sub>. LINC0051 es un lncRNA, que se encuentra expresado al alza en tejido de HCC y, acelera la proliferación y migración en HCC (P. Hu et al. 2019). De manera similar, MIR22HG que se ha sugerido como supresor de tumores en HCC (Wu et al. 2019). Por otro lado, UCA1, (**Figura 4.19A**), se induce por la infección en ambos sistemas, tal y como se ha descrito en pacientes (Carnero et al. 2016) pero vuelve a valores normales tras el tratamiento con DAAs, según uestros datos de validación por RT-qPCR. La inducción de este ncRNA está asociada a cáncer de vejiga (F. Wang et al. 2008). Resulta relevante también la presencia en este grupo de transcritos desregulados por la infección en ambos sistemas relacionados con HCC y su pronóstico: ZFAS2 (H.-L. Zhou et al. 2019), HAGLR (Liao et al. 2018), NORAD (X. Yang et al. 2019), MIR210HG (Y. Wang et al. 2019), si bien vuelven a niveles normales de expresión tras el tratamiento en ambos sistemas, indicando que su desregulación depende de la replicación activa del virus.

Por otro lado, existen 43 transcritos diferencialmente regulados por la infección únicamente en las Huh7<sub>pro</sub> (FDR $\leq$ 0.05; Huh7<sub>DMSO</sub> FDR  $>$ 0.05) (**Figura 4.19B**), mientras que en las Huh7<sub>DMSO</sub> son 69 transcritos (FDR $\leq$ 0.05; Huh7<sub>pro</sub> FDR  $>$ 0.05) (**Figura 4.19C**). De los 43 transcritos diferencialmente expresados únicamente en las Huh7<sub>pro</sub> durante la infección persistente, 20 recuperan niveles normales de expresión tras la erradicación del virus. Entre estos transcritos, se encuentran varios lncRNAs como EGOT o PVT1, que junto con UCA1, aparecen descritos como inducidos por la infección por HCV en Huh7<sub>pro</sub> (Carnero et al. 2016). Resulta llamativo que LINC00907, MONC (MIR99AHG) y LINC00958 se encuentren permanentemente reprimidos en las Huh7<sub>pro</sub>. MONC es un oncogen implicado en leucemia mieloide (Emmrich et al. 2014), y LINC00958 implicado en cáncer de vejiga (Seitz et al. 2017).

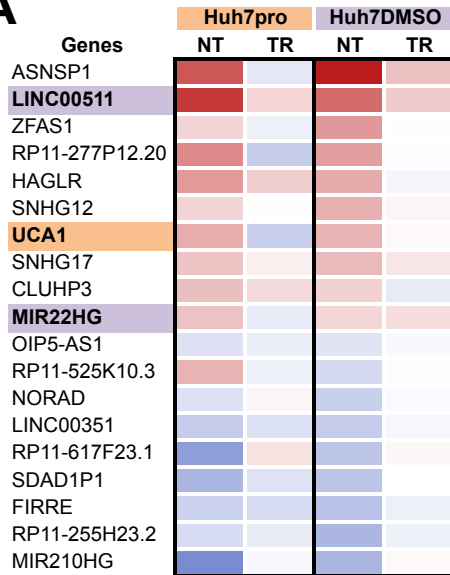
En las células Huh7<sub>DMSO</sub> 69 transcritos aparecen desregulados (**Figura 4.19C**), de los que 42 vuelven a niveles de expresión basales tras la eliminación del virus. A pesar de esta normalización generalizada, aparecen tres transcritos desregulados permanentemente (DLEU2, LINC01419 y CRHR1-IT1). Estos lncRNAs y su expresión diferencial han sido relacionados previamente con la progresión del HCC (H. Zhang et al. 2015; Guo et al. 2019). DLEU2, implicado en la regulación del ciclo celular (Lerner et al. 2009), y LINC01419 se encuentran reprimidos en las células persistentemente infectadas e inducidos tras la erradicación del virus. Cabe destacar que recientemente se ha descrito que los niveles de expresión de LINC01419 se encuentran elevados en muestras de hígado de pacientes con HCC (G. Zhang et al. 2020; Dang et al. 2020).

Estos resultados sugieren que, al igual que para los RNAs codificantes, existe un solapamiento parcial en la alteración inducida por la infección en ambos sistemas de cultivo. De la misma manera que para los transcritos codificantes, no existe apenas solapamiento en la identidad de los transcritos permanentemente desregulados entre los dos sistemas tras la erradicación del virus.

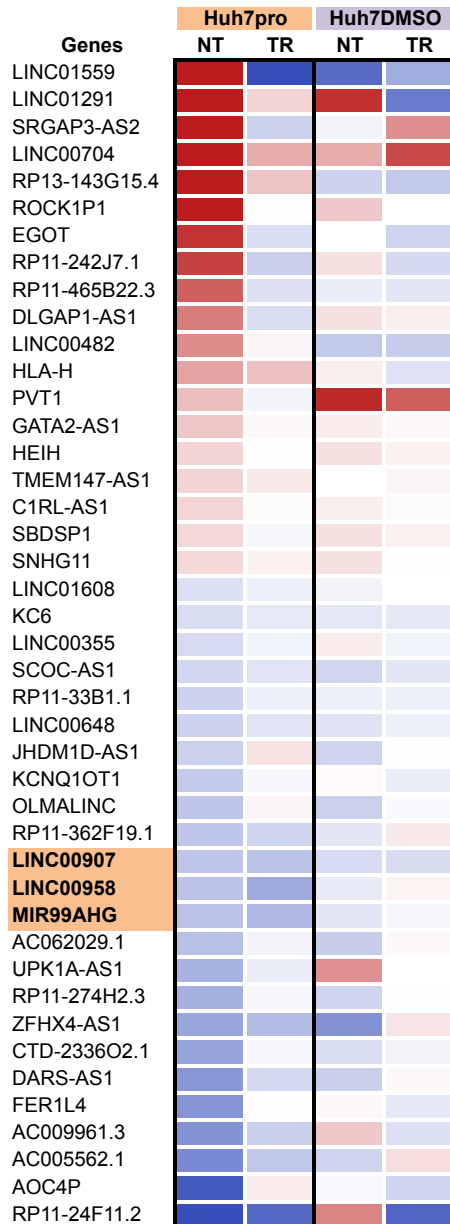
A pesar de que la anotación de transcritos no codificantes es muy inferior a la de los genes codificantes de proteína, se ha podido observar la expresión aberrante de genes implicados en HCC durante la infección persistente por HCV en ambos sistemas de cultivo, observándose la alteración permanente de algunos de ellos a pesar de la erradicación del virus mediante tratamiento con DAAs.

En resumen, en este apartado 4.5 podemos concluir que gracias al estudio simultáneo de los dos modelos experimentales de infección persistente, se ha podido establecer que existen diversos mecanismos por los que se establecen dichas alteraciones transcriptómicas permanentes. Estos mecanismos incluyen la selección de poblaciones celulares de mayor fitness en las distintas condiciones experimentales que emergen por la presión selectiva ejercida por la infección, el tratamiento con antivirales y sus efectos diferenciales sobre poblaciones infectadas y no infectadas. También se han identificado alteraciones que no requieren la selección de poblaciones celulares y que se establecen en la célula hospedadora por mecanismos de acción directa de la infección por HCV.

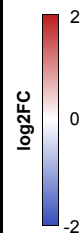
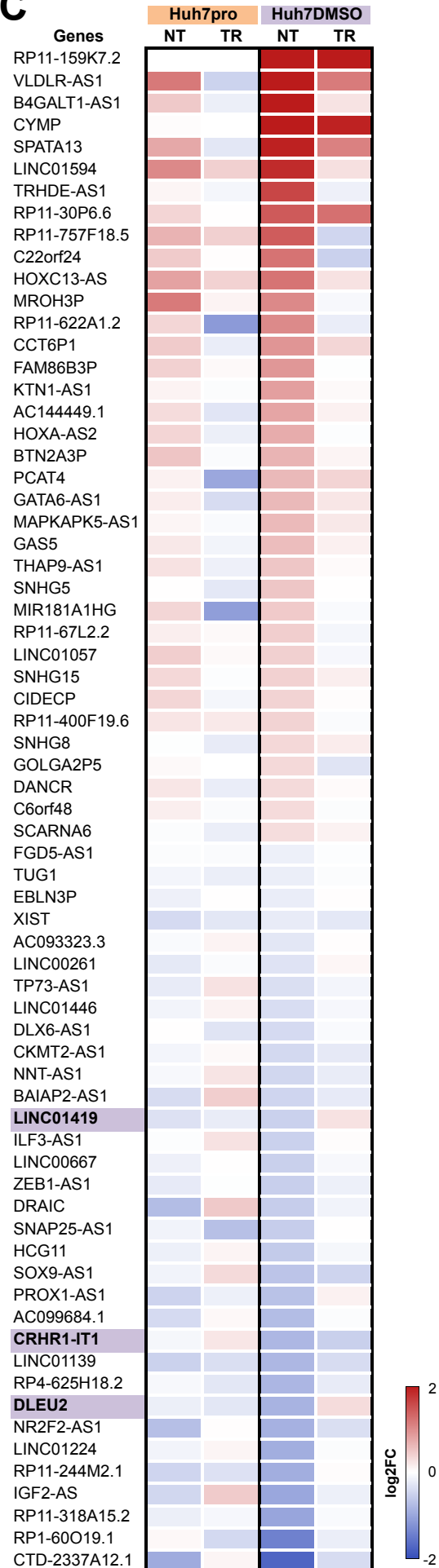
A



B



C



**Figura 4.19 Transcritos no asociados a proteínas (ncRNAs) alterados por la infección por HCV.** **A)** Transcritos alterados en ambos sistemas de cultivo celular durante la replicación activa de HCV (19). **B)** Transcritos alterados durante la infección por HCV únicamente en Huh<sub>pro</sub> (43). **C)** Transcritos alterados durante la infección por HCV exclusivamente en Huh<sub>DMSO</sub> (69). Se encuentran marcados en morados aquellos transcritos que se encuentran permanentemente alterados en Huh7<sub>DMSO</sub> y en naranja aquellos que lo hacen en Huh7<sub>pro</sub>.

#### 4.6. Relevancia clínica potencial: comparación con datos de biopsias de pacientes infectados

En los apartados anteriores se han descrito alteraciones permanentes en el transcriptoma de células persistentemente infectadas por HCV. Nuestros resultados empleando diferentes sistemas experimentales muestran grandes similitudes entre ellos durante la infección. Sin embargo, tras la erradicación del virus, hemos propuesto que dichas alteraciones pueden provenir de una acción directa del virus o de fenómenos de selección de subpoblaciones celulares en modelos donde dicho fenómeno se favorece. Para determinar la relevancia clínica de dichas observaciones y verificar si algunos de los cambios permanentes aparecen también en pacientes, se ha procedido a comparar los datos en cultivo celular con datos de biopsias de pacientes disponibles en repositorios públicos.

En concreto, se han analizado los datos presentados sobre el impacto de HCV en el perfil transcriptómico de biopsias de hígado de pacientes crónicamente infectados (Perez et al. 2019; Boldanova et al. 2017) (Apartado 4.6.1) y sobre las alteraciones epigenéticas permanentes en el hígado de pacientes con infección crónica después de una respuesta virológica sostenida (SVR) (Hamdane et al. 2019) (Apartado 4.6.2).

##### 4.6.1 Alteraciones transcripcionales observadas en biopsias hepáticas de pacientes con infección crónica por HCV

El objetivo de este estudio fue si existe evidencia de que las alteraciones producidas por HCV durante la infección persistente en cultivo celular podrían ocurrir durante la infección crónica en pacientes. Para ello, se compararon las alteraciones en el transcriptoma celular producidas por la infección en nuestros sistemas de cultivo con las generados en pacientes crónicamente infectados. En el estudio por Boldanova et al (Boldanova et al. 2017) (GSE84346), las biopsias de 14 pacientes infectados crónicamente por HCV se sometieron a RNA-seq y los datos se compararon con el perfil transcripcional de las biopsias hepáticas de 6 pacientes no infectados. La cohorte de pacientes fue clasificada por los autores en dos grupos (7 con ISGs bajos y 7 con ISGs altos), según la expresión de 20 transcritos correspondientes a genes estimulados con interferón (IFN). Dada la estructura de los datos, se realizaron las comparaciones diferenciando estos dos grupos de la corte, de los que cabe señalar no presentaban diferencias significativas en cuanto a la carga viral, estimada



por la viremia (Boldanova et al. 2017). En el caso de identificar transcritos que están alterados en estos pacientes, se podrían emplear nuestros resultados en cultivo celular para predecir qué transcritos son candidatos a permanecer alterados en pacientes virológicamente curados.

Por lo tanto, se compararon los transcritos desregulados significativamente en células persistentemente infectadas (1419 transcritos NT<sub>pro</sub> y 3600 NT<sub>DMSO</sub>; FDR≤0.05) con los perfiles transcripcionales de biopsias de hígado de pacientes con infección crónica por HCV (421 transcritos ISGs bajos y 1270 ISGs elevados; FDR≤0.1 según los criterios empleados por los autores en el artículo original).

**Tabla 4.4**

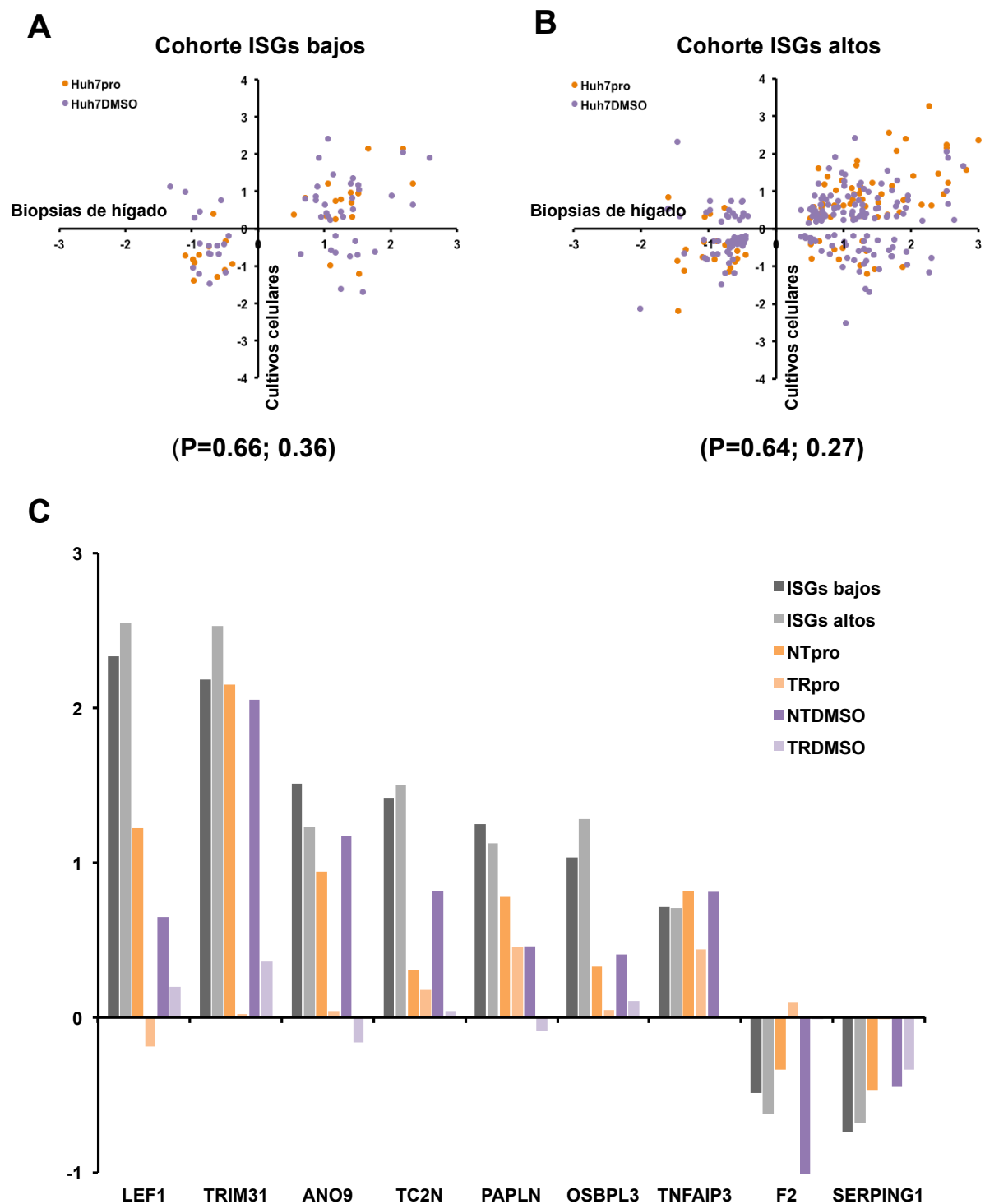
Pacientes	Cultivo celular	
	NT <sub>pro</sub> (1419)	NT <sub>DMSO</sub> (3600)
<b>ISGs bajos (421)</b>	29 transcritos P=0.66	51 transcritos P=0.36
<b>ISGs elevados (1270)</b>	96 transcritos P=0.64	187 transcritos P=0.279

Como resultado de esta comparación (**Tabla 4.4**), se identificaron 29 transcritos en el grupo con NT<sub>pro</sub> y 51 en el grupo con NT<sub>DMSO</sub> alterados significativamente en las biopsias de pacientes con ISGs bajos. La mayoría de los cuales estaban regulados en la misma dirección (**Figura 4.20A**). Sin embargo, estos datos únicamente correlacionaron significativamente con el sistema células proliferativas (Pearson= 0.66).

Cuando se compararon los transcritos alterados procedentes de biopsias de pacientes con ISGs altos, no se observó ninguna correlación significativa con las células quiescentes (**Figura 4.20B**). De los 1270 transcritos alterados en biopsias de pacientes con ISGs altos, 283 se han detectado desregulados también en nuestros sistemas de cultivo (96 transcritos en el grupo con NT<sub>pro</sub> y 187 en el grupo con NT<sub>DMSO</sub>; Pearson= 0.64 y 0.27 respectivamente)(**Figura 4.20B**).

Dado que la correlación entre los pacientes y los conjuntos de datos *in vitro* fue moderada con Huh7<sub>pro</sub> y pobre con las Huh7<sub>DMSO</sub>, seleccionamos los transcritos que estaban regulados en ambos sistemas en la misma dirección (682 transcritos) (Apartado 4.5.1) con el objetivo de encontrar transcritos en los que la alteración *in vitro* es atribuible a la infección persistente por HCV, independientemente del sistema de cultivo celular. Al comparar los

transcritos alterados en biopsias hepáticas, independientemente del grupo, con los datos de los dos sistemas de cultivo celular se identificaron 9 transcritos (LEF1, TRIM31, ANO9, TC2N, PAPLN, OSBPL3, TNFAIP3, SERPING1 y F2) que se encuentran desregulados en ambas cohortes de pacientes en el mismo sentido que en los sistemas de cultivo celular (**Figura 4.20C**). Estos resultados sugieren que una fracción de las alteraciones observadas *in vitro* también se generan en pacientes crónicamente infectados por HCV (Boldanova et al. 2017).



**Figura 4.20. Alteraciones transcripcionales observadas en biopsias hepáticas de pacientes con infección crónica por HCV.** Los datos generados en los dos sistemas de cultivo celular se compararon con los datos publicados en Boldanova et al. (GSE84346). **A)** Genes alterados en Huh7<sub>pro</sub> o Huh7<sub>DMSO</sub> por la infección, alterados también en ISGs bajos **B)** Genes alterados en Huh7<sub>pro</sub> o Huh7<sub>DMSO</sub> por la infección, alterados también en ISGs altos **C)** Genes individuales que están alterados por la infección por HCV en ambos cultivos celulares (NT) y que aparecen correlativamente desregulados en ambas cohortes de pacientes con infección crónica. Las diferencias estadísticamente significativas (\*) corresponden a valores de FDR por debajo de 0.05 (FDR  $\leq$  0.05) para muestras de cultivo celular y FDR < 0.1 para biopsias de pacientes.

Para determinar si alguno de dichos transcritos podría ser candidato a estar permanentemente alterado en pacientes curados se utilizaron los datos disponibles del perfil de expresión de estos genes tras la eliminación del virus. Así, ninguno de los 9 transcritos permanece alterado permanentemente en ambos sistemas de cultivo, sin embargo **SERPING1** se encuentra permanentemente alterado tras la erradicación del virus en Huh7<sub>DMSO</sub> y **TNFAIP3** en Huh7<sub>pro</sub> (**Figura 4.20C**). TNFAIP3, un gen que otros grupos también han observado inducido durante infecciones agudas de HCV (J. Lee et al. 2019), permanece inducido tras la eliminación del virus en células Huh7<sub>pro</sub>, no así en Huh7<sub>DMSO</sub>, donde su expresión regresa a niveles normales tras la eliminación. Cabe destacar que TNFAIP3 se encuentra sobre-expresado en HCC y que su elevada expresión podría limitar la apoptosis inducida por TRAIL (B. Dong et al. 2012). SERPING1, que permanece con niveles de expresión a la baja tras la eliminación del virus en células Huh7<sub>DMSO</sub>, es un gen que codifica principalmente en hepatocitos al inhibidor de C1 esterasa (C1INH), asociado al sistema de complemento. La deficiencia de esta proteína, que se puede detectar en muestras de suero puede causar ciertos tipos de angioedema (Prada et al. 1998), lo que confiere un mayor riesgo de desarrollar un linfoma no-Hodgkin (Castelli et al. 2016).

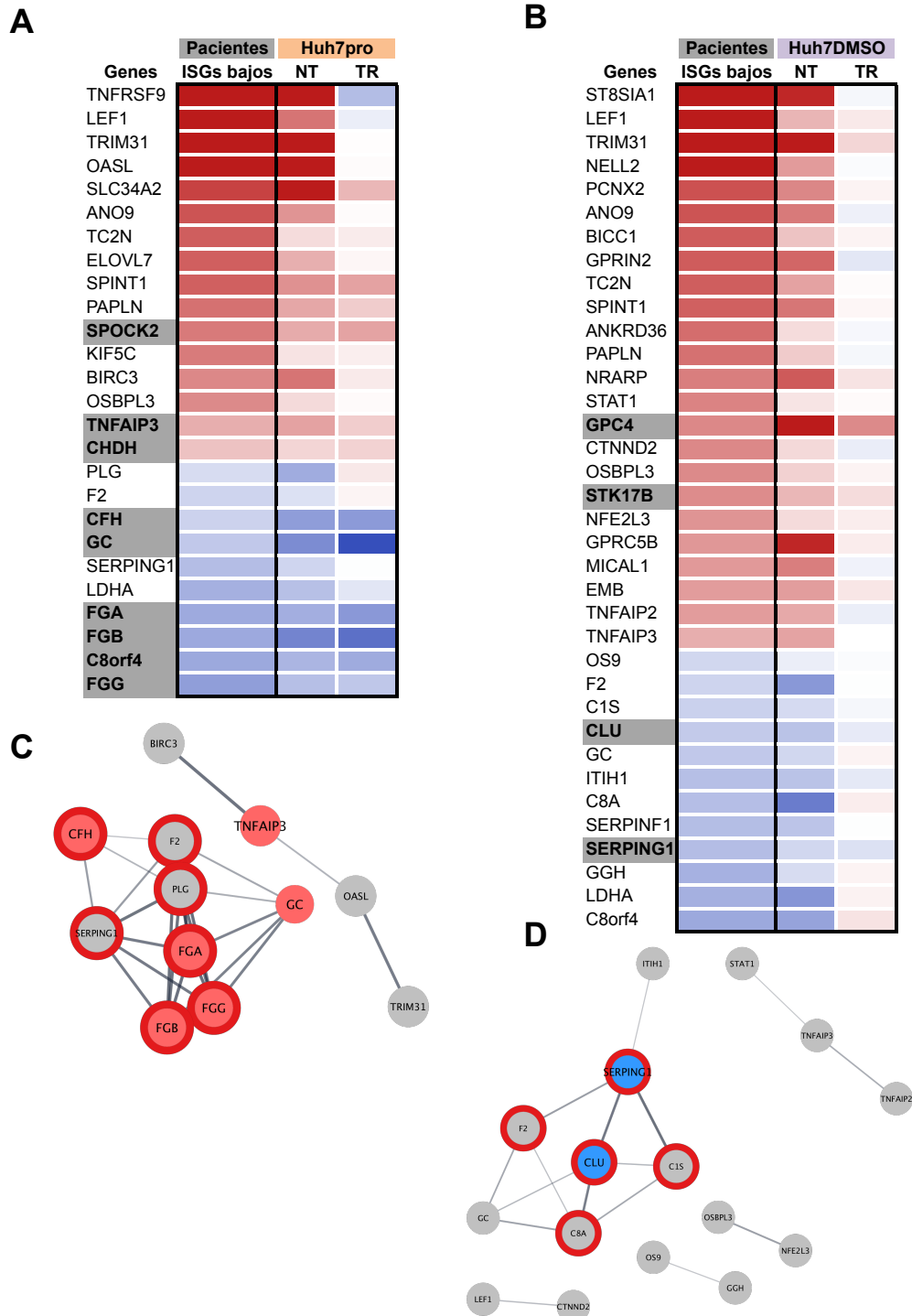
Estos resultados sugieren que tanto TNFAIP3 como SERPING1, alterados transcripcionalmente por la infección por HCV *in vitro* y en biopsias de pacientes, son candidatos a encontrarse alterados permanentemente en pacientes virológicamente curados y ser potencialmente factores de riesgo para el desarrollo de distinto tipo de tumores.

Una vez evaluados los transcritos alterados en ambos sistemas experimentales y en esta cohorte de pacientes, se pasó a determinar si existen transcritos alterados en uno u otro sistema experimental que ocurra en el mismo sentido en el hígado de pacientes infectados. Para ello, se desglosaron las distintas combinaciones generadas entre las dos cohortes de pacientes y los dos sistemas de cultivo celular (**Tabla 4.4**), analizando exclusivamente aquellos transcritos desregulados en la misma dirección.

Comenzando por los transcritos alterados en biopsias de pacientes con ISGs bajos, 26 transcritos se encuentran alterados en la misma dirección en NT<sub>pro</sub> (**Figura 4.21A**) y 36 transcritos en NT<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.21B**). Entre estos transcritos, 9 (SPOCK2, TNFAIP3, CHDH, CFH, GC, FGA, FGB, C8orf4, FGG) se encuentran permanentemente alterados en TR<sub>pro</sub> y 4 (GPC4, STK17B, CLU, SERPING1) en TR<sub>DMSO</sub>, siendo cualquiera de ellos candidatos a permanecer permanentemente alterados tras la eliminación del virus en pacientes virológicamente curados. Sin embargo, cabe destacar que **C8orf4** y **GC** se encuentran alterados durante la infección en ambos sistemas de cultivo, además de TNFAIP3 y SERPING1, lo que refuerza que dichos transcritos están ligados a la replicación de HCV *in vitro*.

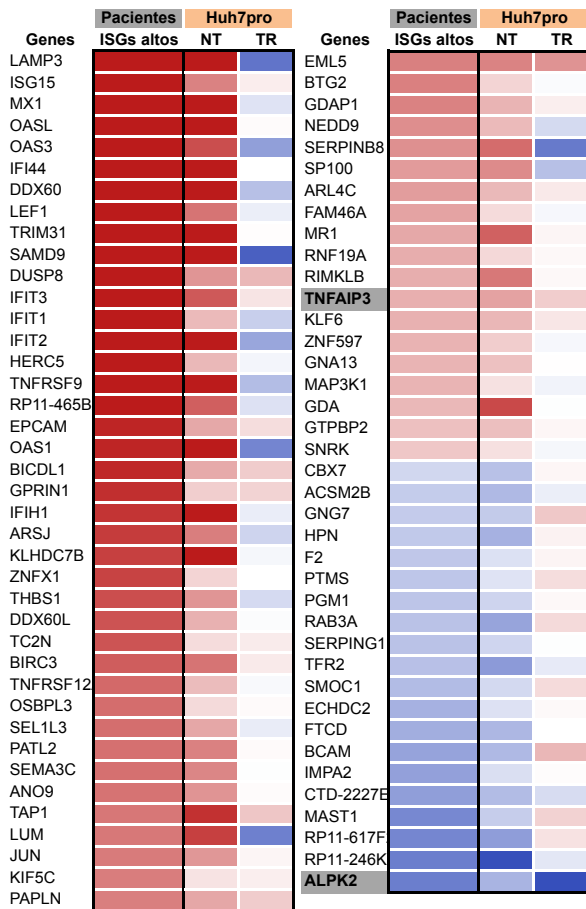
, Resulta especialmente relevante que, independientemente del sistema de cultivo, varios de los transcritos alterados en biopsias de pacientes con ISGs bajos se encuentran asociados a la categoría funcional relacionada con la cascada de coagulación y complemento (**Figura 4.21C; 4.21D**), de la cual se ha hablado previamente por estar permanentemente alterada en nuestros dos sistemas en cultivo celular (Apartado 4.4.1.2). Todos ellos con niveles de expresión a la baja, de los cuales 4 (CFH, FGA, FGB, FGG) se encuentran alterados permanentemente en Huh7<sub>pro</sub>, y 2 (CLU, SERPING1) en Huh7<sub>DMSO</sub>, por lo que son posibles candidatos a permanecer desregulados en pacientes curados. Cabe destacar que **FGB** está regulado significativamente a la baja también tras el tratamiento en Huh7<sub>DMSO</sub>. Recientemente se ha publicado la asociación de HCV con el desequilibrio procoagulante en pacientes infectados, incluso en ausencia de cirrosis (Sigon et al. 2019). Esto, junto con nuestros datos, sugiere que podrían existir alteraciones no reversibles por tratamiento con DAAs de la cascada de coagulación y complemento en pacientes crónicos incluso tras la eliminación del virus.

En biopsias de pacientes con ISGs elevados, 79 transcritos se encuentran alterados en la misma dirección en NT<sub>pro</sub> (**Figura 4.22A**) y 125 transcritos en NT<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.22B**). Entre estos transcritos, 2 (TNFAIP3, ALPK2) se encuentran permanentemente alterados en TR<sub>pro</sub> y 18 (THBS1, GPC4, STK17B, NEDD9, FAM46A, CHML, KIF5B, SOCS4, UGCG, ZNF441, TXNRD1, ACER3, SNRK, VTN, SERPINF2, SERPING1, CLU, BCAM) permanecen alterados permanentemente en células Huh7<sub>DMSO</sub>, por lo que constituyen genes candidatos a examinar en pacientes curados. Especialmente destacan **GPC4**, **STK17B** y **CLU** porque se encuentran alterados en ambas cohortes de pacientes (**Figura 4.21B; 4.22B**), lo que refuerza que dichos transcritos están alterados en pacientes crónicamente infectados. Además, se ha publicado que STK17B promueve la carcinogénesis en HCC (Lan et al. 2018) y que el incremento de expresión de GPC4 se ha observado en células de cáncer de páncreas (J. Cao et al. 2018).

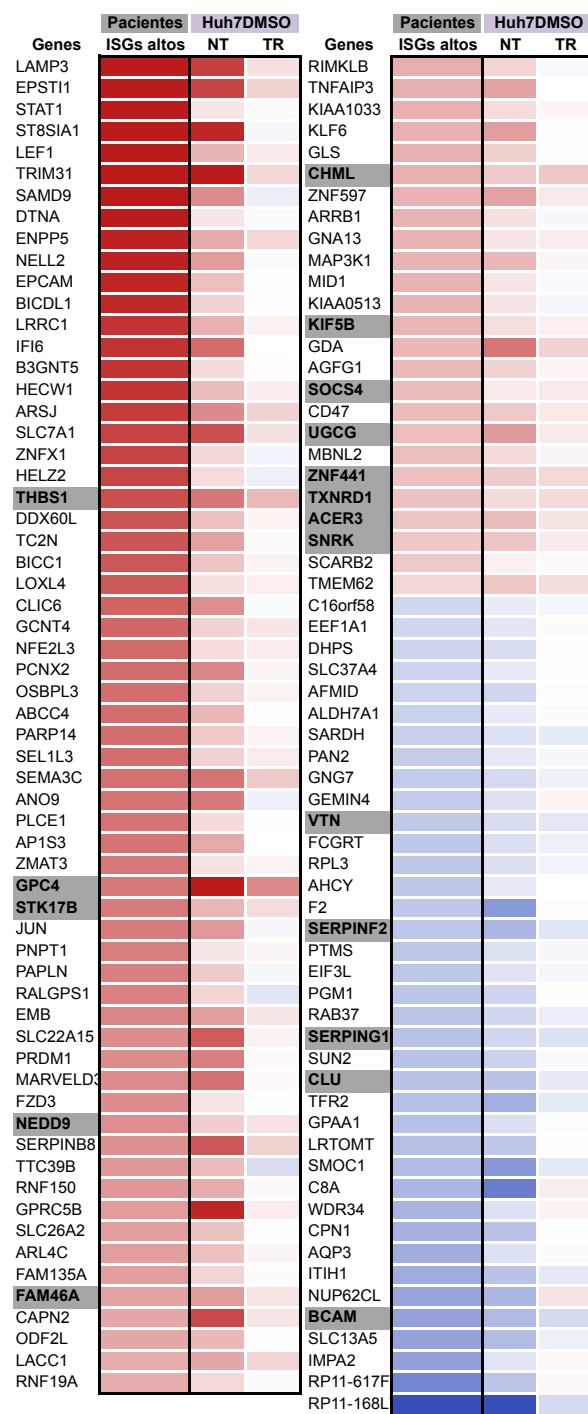


**Figura 4.21. Alteraciones transcripcionales observadas en biopsias hepáticas de pacientes con ISGs bajos.** Los datos generados en los dos sistemas de cultivo celular se compararon con los datos publicados en Boldanova et al. (GSE84346). **A)** Genes alterados en Huh7<sub>pro</sub> **B)** Huh7<sub>DMSO</sub> que están desregulados por la infección por HCV y que aparecen correlativamente desregulados en la cohorte de pacientes con ISGs bajos. Las diferencias estadísticamente significativas (\*) corresponden a valores de FDR por debajo de 0.05 (FDR ≤0.05) para muestras de cultivo celular y FDR <0.1 para biopsias de pacientes. **C y D)** ORA realizado en Cytoscape sobre los transcritos del apartado A y B respectivamente.

**A**



**B**



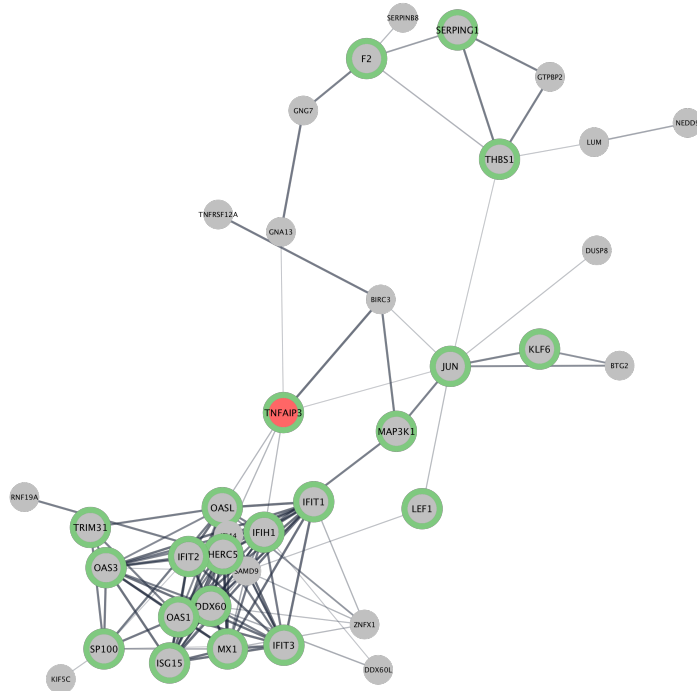
**Figura 4.22. Alteraciones transcripcionales observadas en biopsias hepáticas de pacientes con ISGs altos.** Los datos generados en los dos sistemas de cultivo celular se compararon con los datos publicados en Boldanova et al. (GSE84346). **A)** Genes alterados en Huh7pro- **B)** Huh7DMSO que están desregulados por la infección por HCV y que aparecen correlativamente desregulados en la cohorte de pacientes con ISGs altos. Las diferencias estadísticamente significativas (\*) corresponden a valores de FDR por debajo de 0.05 ( $FDR \leq 0.05$ ) para muestras de cultivo celular y  $FDR < 0.1$  para biopsias de pacientes.

Realizando un ORA de los transcritos alterados durante la infección en las biopsias de pacientes con ISGs altos y en NT<sub>pro</sub> (**Figura 4.22A**) o NT<sub>DMSO</sub> (**Figura 4.22B**), destaca que una gran parte de transcritos alterados corresponden con transcritos relacionados con sistema inmune (GO Process). Así, 31 de los 79 transcritos que se alteran en NT<sub>pro</sub> y la cohorte con ISGs altos pertenecen a esta categoría (**Figura 4.23A**). Todos ellos, excepto TNFAIP3, vuelven a niveles de expresión normales en las células proliferativas tras la erradicación del virus, como MX1 e ISG15 validados por RT-qPCR (**Figura 4.7**).

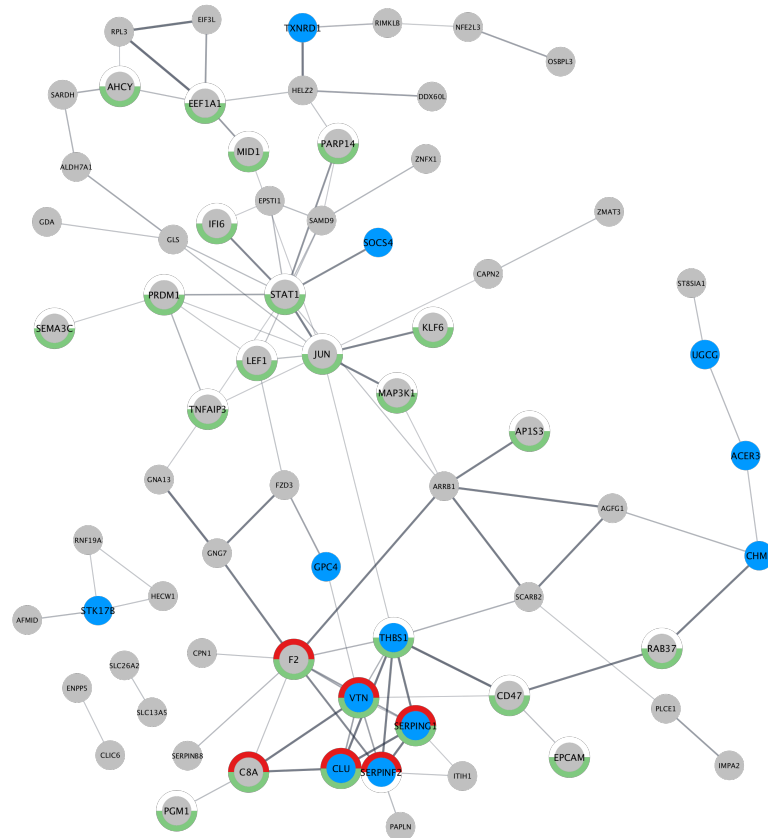
De manera similar ocurre entre los transcritos alterados en NT<sub>DMSO</sub> y la cohorte con ISGs altos (**Figura 4.23B**), donde 29 de los 125 transcritos corresponden con transcritos relacionados con sistema inmune (GO Process). De nuevo, la mayoría de estos transcritos vuelven a niveles de expresión normales en las células quiescentes tras la erradicación del virus. Sin embargo, VTN, CLU y SERPING1 se mantienen alterados a la baja.

En general, estos resultados sugieren una modesta superposición de los datos *in vitro* con el perfil transcripcional de las biopsias hepáticas en pacientes con infección crónica. A pesar de esto, la fusión de los datos de los dos sistemas de cultivo celular proporciona una lista de genes candidatos que no se normalizan después de la erradicación del virus en el cultivo celular (SERPING1, TNFAIP3, C8orf4, GC, FGB, GPC4, STK17B y CLU) que merecen una mayor investigación en el entorno clínico para su posible alteración incluso después de la eliminación del virus.

**A**



**B**



**Figura 4.23. Alteraciones transcripcionales observadas en biopsias hepáticas de pacientes con ISGs altos. A) NT<sub>pro</sub><sup>-</sup> B) NT<sub>DMSO</sub><sup>-</sup> y la cohorte con ISGs altos transcritos relacionados con sistema inmune (GO Process)**



#### 4.6.2 Modificaciones epigenéticas permanentes observadas en biopsias de hígado de pacientes con SVR mediada por DAAs

Los resultados obtenidos en ambos sistemas de cultivo celular indican que existen alteraciones transcripcionales permanentes causadas por la infección por HCV. Estos datos sugieren que HCV podría tener un impacto irreversible sobre el epigenoma de la célula hospedadora, y como consecuencia alterar su perfil transcripcional de una manera no reversible a pesar de la eliminación del virus. Un estudio reciente en pacientes y ratones humanizados caracteriza un panel de cambios epigenéticos en respuesta a la infección por HCV y su reversibilidad después de la SVR mediada por DAAs, concluyendo que HCV induce modificaciones epigenéticas permanentes asociadas con el riesgo de cáncer de hígado (Perez et al. 2019; Hamdane et al. 2019).

Empleando los perfiles de inmunoprecipitación diferencial de cromatina (ChIP-Seq) basados en la acetilación de H3K27 (H3K27ac), una modificación de la histona 3 asociada a la activación de la transcripción (Calo & Wysocka 2013), el objetivo fue determinar si alguna de las alteraciones transcripcionales observadas en nuestros sistemas cultivo celular están respaldadas por marcas diferenciales H3K27ac en los genes correspondientes obtenidas en biopsias hepáticas de pacientes con infección crónica, antes y después de la eliminación del virus. En los análisis de Hamdane et al. se obtuvieron cambios significativos de los niveles de H3K27ac en 2193 genes de pacientes infectados por HCV que permanecen en los dos grupos de pacientes (según su grado de fibrosis) curados con DAAs (Hamdane et al. 2019). Cuando este conjunto de datos se comparó con los perfiles transcripcionales de los cultivos celulares infectados de forma persistente, se identificaron 174 transcritos alterados significativamente en Huh7<sub>pro</sub> (174/1419 NT<sub>pro</sub>) y 404 en Huh7<sub>DMSO</sub> (404/3600 NT<sub>DMSO</sub>) presentaban modificaciones persistentes de H3K27ac en biopsias de hígado de pacientes.

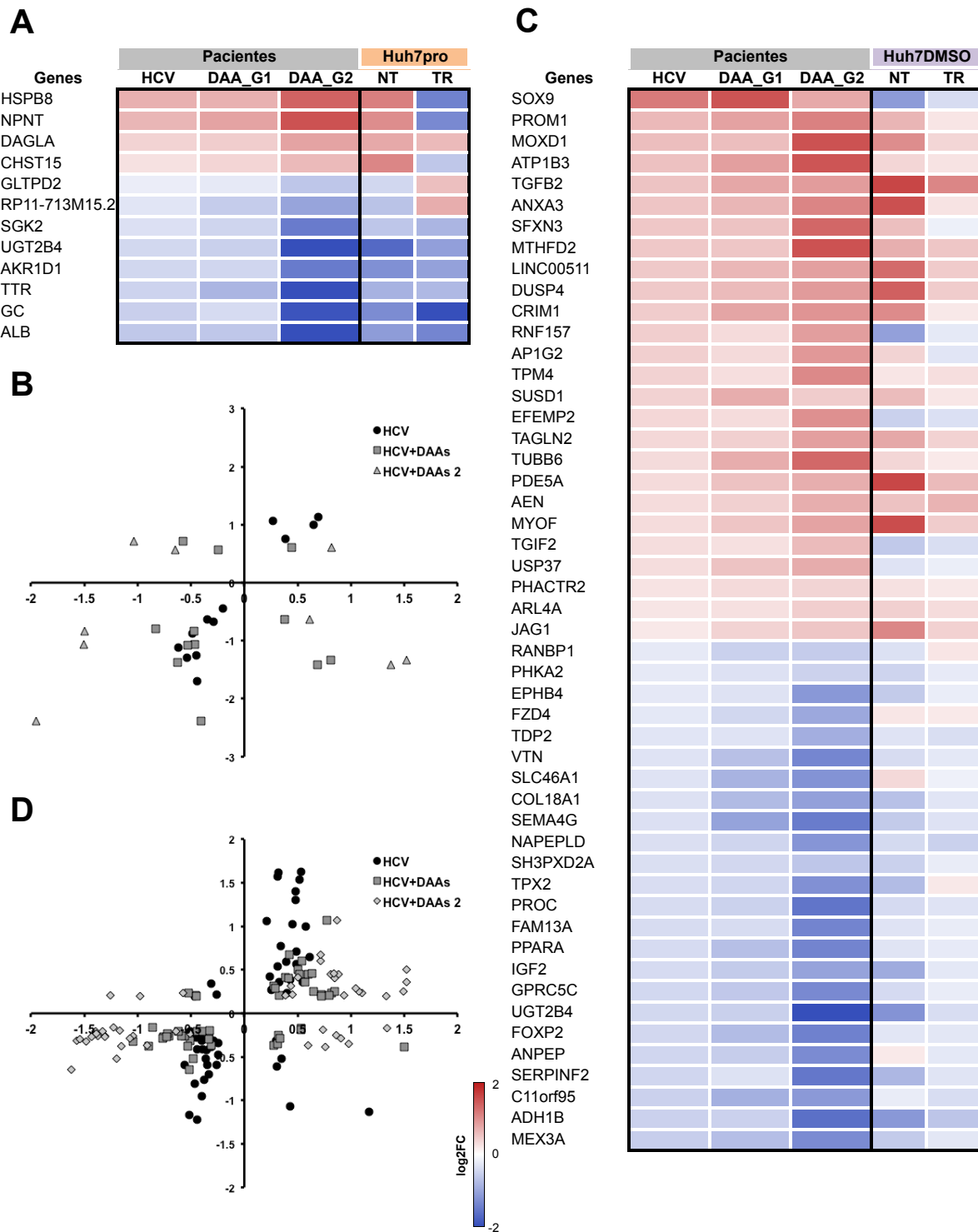
Una vez establecido este paralelismo, se seleccionaron exclusivamente aquellos transcritos alterados en cultivo celular durante la infección y que permanecen alterados tras la erradicación del virus. En Huh7<sub>pro</sub>, únicamente 12 genes alterados transcripcionalmente de manera persistente en células proliferativas presentan modificaciones persistentes de H3K27ac (**Figura 4.24A**). Las alteraciones transcripcionales en cultivo celular durante la infección se correlacionan con las modificaciones H3K27ac en biopsias hepáticas antes del tratamiento (Pearson= 0.94) (**Figura 4.24B**), sin embargo tras la eliminación del virus 5 de los 12 transcritos (HSPB8, NPNT, GLTPD2, CHST15 y RP11-713M15.2) presentan un cambio en la dirección de la regulación y no se relacionan con las modificaciones de H3K27ac (Grupo1 DAAs Pearson= -0.0002; Grupo2 DAAs=0.20) (**Figura 4.24A**). No obstante, identificamos 7 transcritos (SGK2, TTR, AKR1D1, DAGLA, GC, UGT2B4, ALB) desregulados significativamente antes y después de la erradicación del virus, que

concuerdan con la abundancia diferencial de H3K27ac en biopsias hepáticas de pacientes después de una SVR mediada por DAAs. Todos ellos, excepto DAGLA, reducen sus niveles de expresión durante la infección y permanecen persistentemente reprimidos tras la erradicación del virus.

Un análisis similar en Huh7<sub>DMSO</sub> reveló que existen 50 genes con alteraciones transcripcionales persistentes asociadas a HCV en cultivo celular y modificaciones epigenéticas en biopsias hepáticas de pacientes, de los cuales 38 mostraron correlación entre la regulación transcripcional y la abundancia de H3K27ac (**Figura 4.24C**). Por lo tanto, a diferencia de en las células proliferativas, los niveles de H3K27ac después de la SVR se correlacionaron (Grupo1 DAAs Pearson=0.57; Grupo2 DAAs Pearson=0.62) (**Figura 4.24D**) con las alteraciones transcripcionales permanentes observadas después de la erradicación del virus en las células quiescentes. Entre los transcritos inducidos se encuentran TGFB2 (Chen et al. 2019), LINC00511 (P. Hu et al. 2019), ambos inducidos a nivel transcripcional en tejido de HCC. Ya se ha señalado un papel potencial para TGFB2 en la inducción de transcritos relacionados con EMT en cultivo celular (**Figura 4.18B**). Además, LINC00511 acelera la proliferación y migración en HCC (P. Hu et al. 2019; W.-Y. Hu et al. 2020), lo que lo convierte en un marcador de predicción de baja prognosis en pacientes.

Entre los transcritos para los que se observa reducción en sus niveles de expresión, se encuentran PROC, SERPINF2 y VTN, asociados a la cascada de complemento y coagulación. Especialmente relevante es VTN, que también se encuentra con niveles de expresión a la baja en biopsias de en pacientes con ISGs altos (**Figura 4.20B**). Además, cabe destacar que UGT2B4 se encuentra reprimido significativamente de manera persistente en ambos sistemas de cultivo y sus niveles de expresión correlacionan con la abundancia diferencial de H3K27ac en biopsias hepáticas de pacientes con HCV y pacientes con una SVR mediada por DAAs.

Estos resultados indican que una fracción considerable de las alteraciones transcripcionales permanentes observadas en Huh7<sub>DMSO</sub> también se encuentran en biopsias de hígado de pacientes utilizando un marcador epigenético sustituto de activación transcripcional, lo que respalda la idea de que la infección por virus puede alterar permanentemente el epigenoma de la célula hospedadora, a pesar de la eliminación del virus tanto *in vivo* en pacientes como *in vitro* en cultivo celular.



**Figura 4.24. Comparación del conjunto de datos de cultivo celular con modificaciones epigenéticas permanentes observadas en biopsias de hígado de pacientes con SVR mediada por DAAs . A)** Transcritos individuales que están permanentemente desregulados por la infección por HCV en células proliferativas y que presentan modificaciones epigenéticas en pacientes con infección crónica y tratados con DAAs **C)** Transcritos individuales que están permanentemente desregulados por la infección por HCV en células quiescentes y que presentan modificaciones epigenéticas en pacientes con infección crónica y tratados con DAAs. Las diferencias estadísticamente significativas (\*) corresponden a valores de FDR por debajo de 0.05 ( $FDR \leq 0.05$ ) para muestras de cultivo celular y  $FDR < 0.1$  para biopsias de pacientes. **B) y D)**

## 5. DISCUSIÓN

Las actuales terapias basadas en antivirales de acción directa (DAAs) frente a HCV son altamente efectivas en cuanto a la eliminación de la infección crónica en pacientes infectados con tratamientos relativamente cortos y carentes de efectos adversos (PMID 32956768). La eliminación de la infección o respuesta virológica sostenida (SVR) conlleva una notable reducción en la mortalidad de pacientes con o sin patología hepática avanzada y una reducción generalizada en la progresión de la enfermedad hepática, incluso con fenómenos de regresión de fibrosis hepática, incluso de reducción en la incidencia la descompensación de la cirrosis, dependiendo del grado de la patología hepática (Verna et al. 2020). Esta mejora generalizada en la evolución de las patologías asociadas a la infección crónica por HCV ha llevado a una reducción drástica en el número de pacientes en lista de espera para el trasplante de hígado (Ioannou & Feld 2019). Esta evidente mejoría en las funciones hepáticas viene acompañada de una disminución de la incidencia de otras patologías extrahepáticas típicamente asociadas con la infección crónica por HCV (Sagnelli et al. 2021). Por lo tanto, existe un consenso evidente en la comunidad médica en cuanto al beneficio de la eliminación de la infección crónica para contener el grave problema biomédico asociado a la infección crónica por HCV.

Sin embargo, este consenso se rompe a la hora de valorar la capacidad de los tratamientos con DAAs de eliminar la incidencia, recurrencia y severidad del HCC. Poco tiempo después de la aprobación de los tratamientos con DAAs, surgieron estudios que señalaban una incidencia elevada de casos de HCC en pacientes curados con DAA, un fenómeno no observado previamente con tratamientos basados en IFN (Reig et al. 2016) (Conti et al. 2016) (Ravi et al. 2017). A pesar de que los nuevos estudios señalan un beneficio clínico hacia una reducción de la incidencia (Calvaruso & Craxì 2020), aún existe preocupación en el campo por el desarrollo de HCC en pacientes curados (PMID 33741640).

En esta tesis doctoral se decidió estudiar y caracterizar *in vitro* el transcriptoma de las células infectadas persistentemente por HCV antes y después de la eliminación del virus, haciendo especial hincapié en la capacidad de los DAAs de erradicar el virus y revertir las posibles alteraciones producidas en el transcriptoma de la célula hospedadora. Se desarrollaron *in vitro* dos modelos de infección persistente con HCV utilizando el genotipo 2<sup>a</sup> utilizando la línea celular de hepatoma humano Huh-7. Uno de los modelos basado en cultivos proliferativos (Huh7<sub>pro</sub>) (Figura 4.1) y otro en cultivos quiescentes, parcialmente diferenciados (Huh7<sub>DMSO</sub>) (Figura 4.2; 4.3) (Zhong et al. 2006; Castro, Ávila-Pérez, et al. 2019).

## Nuestros sistemas de infección en cultivo celular

La infección persistente por HCV produce profundos cambios tanto morfológicos como funcionales en la célula (Intro 1.1.3), entre ellos se encuentra la remodelación de las membranas celulares, principalmente del ER, para formar los complejos de replicación generando así una "red membranosa" que contiene la replicasa viral y promueve la producción del RNA viral (Romero-Brey et al. 2012) (Pérez-Berná et al. 2016) y el ensamblaje de viriones progenie (J.-Y. Lee et al. 2019). Estos complejos, además de proporcionar una separación física que protege el RNA viral de los sensores celulares implicados en los mecanismos de defensa antiviral de la célula hospedadora, permite concentrar todos aquellos componentes necesarios para la replicación. Las alteraciones de la homeostasis celular inducidas por la infección persistente, genera una nueva homeostasis en un equilibrio que promueve la replicación viral y la supervivencia de la célula infectada, evitando así la apoptosis celular (Vasallo & Gastaminza 2015) (Ríos-Ocampo et al. 2019).

Los datos transcriptómicos generados en esta Tesis Doctoral refuerzan la evidencia de que la infección promueve una nueva homeostasis celular. Estos cambios producidos durante la infección persistente por el genotipo 2a son muy robustos en cultivo celular, puesto que el 48% de los transcritos alterados en Huh7<sub>pro</sub> y 19% en Huh7<sub>DMSO</sub> presentan perfiles de expresión génica en la misma dirección (Figura 4.10). Estos transcritos se agrupan y sobrerrepresentan distintas categorías funcionales previamente descritas relacionadas tanto con la respuesta celular a la infección como "TNF signaling pathway", "NF-kappa B signaling pathway" y "Apoptosis" (Park et al. 2012) (Haqshenas et al. 2017) como categorías funcionales relacionadas con el ciclo celular o asociadas a cáncer (Figura 4.8). Este conjunto de 682 transcritos alterados durante la infección persistente *in vitro* sugieren un cambio persistente de la homeostasis celular, independientemente de que sean cultivos proliferativos o quiescentes, generando un equilibrio para la supervivencia de las células en cultivo celular mientras HCV continúa replicando y produciendo progenie viral (Figura 4.1; 4.3). Es importante recalcar que los datos de RNA-seq son robustos y reproducibles, ya que los datos obtenidos en Huh7<sub>pro</sub> corresponden a dos experimentos en dos años diferentes con dos poblaciones independientes en cada uno. En el caso de los datos de RNA-seq de Huh7<sub>DMSO</sub>, han sido obtenidos en un único experimento con tres replicas biológicas, pero cuyas alteraciones más relevantes han sido validados por RT-qPCR en un total de siete replicas biológicas de dos experimentos independientes.

Aunque se trata de un modelo reduccionista, la principal ventaja de estudiar las alteraciones transcriptómicas en cultivo celular frente los análisis de biopsias de pacientes (Boldanova

et al. 2017; Hamdane et al. 2019; Lupberger et al. 2019), además de la limitación de disponibilidad de biopsias de pacientes curados sin patologías graves asociadas (cirrosis, hepatocarcinoma), es la capacidad de definir los cambios producidos por la acción directa del virus sobre la célula hospedadora. En los modelos en cultivo celular descritos se elimina el “ruido” que deriva de la respuesta inmunitaria, inflamación, fibrosis e infiltrados inflamatorios. Por lo tanto, los sistemas de cultivo celular *in vitro* se presenta en esta Tesis Doctoral como un modelo válido para identificar a alteraciones transcriptómicas permanentes en la célula infectada y tratar de comprender los mecanismos fundamentales que subyacen a estas alteraciones.

A lo largo de los últimos años han existido múltiples estudios sobre el impacto de la infección por HCV sobre el transcriptoma celular (Walters et al. 2009) (Luna et al. 2015) (Lupberger et al. 2019). Todos estos estudios han sido realizados en el contexto de infecciones agudas, en el que la muerte celular asociada a la infección en células hipersusceptibles y la selección de subpoblaciones celulares resistentes ha impedido el seguimiento adecuado de la reversión de dichas alteraciones por el tratamiento con DAAs. Los modelos de infección que se describen en esta Tesis Doctoral tienen la ventaja de estudiar infecciones persistentes, prolongadas en el tiempo y en ausencia de muerte celular (Castro, Ávila-Pérez, et al. 2019). Además, controlamos la posible selección de subpoblaciones resistentes mediante el estudio de infecciones en células quiescentes, aportando un punto de vista adicional a la resolución de las alteraciones inducidas por HCV.

El sistema de Huh7<sub>pro</sub> es un sistema que permite estudiar las alteraciones transcripcionales derivadas de la selección de subpoblaciones celulares, poblaciones (epi)-genéticamente diferentes caracterizadas por una mayor capacidad de crecimiento y mayor resistencia a la infección (Zhong et al. 2006). Las alteraciones permanentes observadas asociadas con cambios inducidos durante la infección por HCV presentan dos perfiles claramente diferenciados. Existe un conjunto de genes que presentan alteraciones muy semejantes antes y después del tratamiento, lo que indica que el cambio es independiente de la presencia o no de maquinaria viral. Dado que el proceso de infección en Huh7<sub>pro</sub> se realiza en poblaciones susceptibles de establecer procesos de selección, es posible que alteraciones que favorezcan el crecimiento se vean seleccionadas incluso antes del tratamiento y permanezcan inalteradas porque aumentan el fitness de la población celular independientemente de la presencia del virus. En este sentido, este proceso de deriva transcriptómica se observa en células no infectadas, y en ocasiones el fenómeno puede verse reforzado por la replicación viral. Por otro lado, existen alteraciones permanentes que presentan un sentido de regulación opuesto al observado durante la replicación viral, algo que indica que, el proceso de eliminación del virus conlleva nuevas necesidades en la

población celular curada. Cabe destacar que muchos de las alteraciones que se manifiestan de igual manera en ambos sistemas de infección durante la replicación son revertidos a niveles normales en células quiescentes mientras que permanecen alterados en cultivos proliferativos. En estos casos, la selección poblacional es un fenómeno capaz de explicar las diferencias observadas.

El sistema de Huh7<sub>DMSO</sub> limita la proliferación celular, evitando así la citada posible selección poblacional. En este contexto, las alteraciones transcriptómicas pueden adscribirse a un impacto directo de la infección sobre la célula hospedadora sin que el fitness de la población celular contribuya a la selección de determinados transcriptomas más compatibles con la proliferación rápida requerida dadas las condiciones de cultivo. Sin embargo, existen discrepancias en los cambios de magnitud ( $\log_2FC$ ) de los 193 transcritos permanentemente alterados en la misma dirección entre las células tratadas y sin tratar en el sistema de cultivos quiescentes (Figura 4.17B). Este hecho suscita la duda de si realmente son transcritos alterados de manera irreversible o si por el contrario son transcritos que están en proceso de reversión a niveles de expresión “normales”. Aunque cabe considerar esta posibilidad, la mayor parte de los cambios existentes durante la replicación son reversibles tras el tratamiento (dos semanas de tratamiento con DAAs + dos semanas en ausencia de tratamiento). Sin embargo, existe un conjunto no despreciable de transcritos que presenta una magnitud de cambio comparable antes y después del tratamiento. Además, un aspecto de valorable es que las muestras analizadas por RNA-seq son las procesadas al final del experimento, es decir que las células infectadas persistentemente han estado expuestas a la replicación persistente cuatro semanas más que las células tratadas con DAAs. En cualquier caso, si las alteraciones irreversibles se hubieran reducido en magnitud respecto a la magnitud observada durante la replicación activa, son cambios que se han mantenido durante un mes desde el comienzo del tratamiento, mientras que el RNA viral detectable mediante RT-qPCR se reduce en dos días (Figura 4.3). Finalmente, algunas de las alteraciones permanentes podrían darse únicamente en una fracción de las células infectadas, computando como una fracción del máximo de la magnitud observada. Esta última consideración es relevante para la discusión de los resultados en torno a la posible inducción de EMT en los cultivos quiescentes.

A pesar de ser sistemas muy alejados del contexto real de la infección y de su curación, hemos podido observar que un número sustancial de alteraciones transcriptómicas observadas en cultivo celular tiene su refrendo en biopsias de pacientes crónicamente infectados y que existe evidencia clínica de alteraciones epigenéticas que son compatibles con cambios observados en cultivos celulares (Apartado 4.6). Con la prudencia que requiere la distancia existente entre los modelos de cultivo celular y el hígado infectado, se

ha estudiado la correlación entre los transcritos identificados en uno u otro sistema con los datos de pacientes crónicamente infectados (Figura 4.20). Los resultados obtenidos sugieren que ciertos aspectos fundamentales de la infección en pacientes se recapitulan a nivel molecular en los sistemas *in vitro*, aunque resulta evidente que es una minoría de los cambios generales observados.

Un estudio reciente sobre las modificaciones epigenéticas detectadas en biopsias de hígados de pacientes infectados ha permitido elaborar un listado de genes cuya expresión se ve reducida por la reducción en H3K27 en sus regiones reguladoras. Este set de datos correlaciona de manera muy significativa (Pearson's=0.89) con los datos de RNA-seq de Boldanova et al. (Boldanova et al. 2017), lo que sugiere que es un método adecuado para detectar alteraciones permanentes tras el tratamiento. Al comparar los datos tras la eliminación del virus, se han observado numerosos transcritos permanentemente alterados en los sistemas de cultivo celular cuya expresión correlaciona con la expresión de genes alterados en pacientes curados con DAAs (Figura 4.24), lo que refuerza la noción de que estos sistemas podrían predecir algunos aspectos relacionados con el impacto de la infección sobre la célula hospedadora. No obstante, consideramos que la ausencia de evidencia de una alteración transcriptómica en la biopsia no conlleva que ésta no exista. Dados los resultados positivos de correlación, trabajamos con la hipótesis de que las alteraciones transcriptómicas observadas en cultivo celular no detectadas en pacientes pueden ocurrir *in vivo*, aunque no se haya podido certificar su existencia por la heterogeneidad de los datos de las biopsias o por la relativa baja frecuencia de células que presentan alteraciones transcriptómicas irreversibles *in vivo*. Que una pequeña población de células presente alteraciones transcriptómicas permanentes puede no tener un impacto significativo para funciones generales del hígado, pero pueden ser determinantes a la hora de iniciar un proceso tumoral como veremos más adelante durante la discusión de los hallazgos en el contexto del desarrollo de HCC. Por lo tanto, consideramos que el catálogo de alteraciones permanentes descritas en este trabajo merecen consideración en este sentido, independientemente de que se hayan verificado en pacientes.

En este sentido, cabe señalar que los datos en cultivo celular nos han permitido identificar más de 170/404 alteraciones transcriptómicas reguladas en el mismo sentido por HCV en cultivos celulares quiescentes y en las cohortes de pacientes infectados que son susceptibles de normalización en cultivo celular por tratamiento con DAAs, pero que permanecen alteradas tras el tratamiento en las biopsias de pacientes infectados. Esta información obtenida *in vitro* puede ser muy útil a la hora de comprender los mecanismos por los que los pacientes curados presentan dichas alteraciones transcriptómicas permanentes, ya que parece descartable la opción de que respondan a una incapacidad de



los DAAs de revertir el impacto directo del virus sobre el transcriptoma de la célula hospedadora.

Por lo tanto, consideramos que el estudio comparativo de la infección persistente en poblaciones proliferativas y quiescentes constituye un estudio sin precedentes que puede desvelar aspectos relevantes para la patogénesis por HCV que resultan indetectables en muestras clínicas.

### **Tratamientos con otros DAAs**

Tal y como hemos descrito en la introducción, existe un amplio arsenal farmacológico frente a HCV. En nuestros estudios, se seleccionaron sofosbuvir (SOF) y daclatasvir (DCV) como los mejores DAAs candidatos para erradicar el virus en cultivo celular, puesto que en el ámbito clínico son efectivos en uso combinado hasta en un 99% de los casos (Sulkowski et al. 2014) (D. R. Nelson et al. 2015). Los resultados obtenidos detectando RNA viral mediante RT-qPCR y más tarde mediante RNA-seq, y los ensayos de inmunofluorescencia frente a la proteína viral E2 en ambos modelos de infección persistente confirman la efectividad de SOF y DCV en uso combinado para erradicar la infección (Figura 4.1; Figura 4.3).

En este estudio únicamente se ha analizado la combinación de SOF junto con DCV, sin embargo la eficacia de otras combinaciones de DAAs en clínica (Falade-Nwulia et al. 2017), sugiere que estas deberían ser también efectivas en la erradicación del virus en cultivo celular, quedando pendiente establecer si otras combinaciones de antivirales darían lugar a unas secuelas moleculares semejantes a las observadas. Teniendo en cuenta que el impacto directo de los DAAs sobre el transcriptoma celular es muy limitado (Figura 4.5), más allá de la deriva poblacional observada en Huh7<sub>pro</sub>, cabe esperar que, al menos en un cultivo Huh7<sub>DMSO</sub>, otras formas inocuas de erradicación conduzcan a observaciones semejantes a las presentadas con SOF/DCV.

### **Otros genotipos**

Puesto que HCV se clasifica en 7 genotipos con diversidad genética (Simmonds 2013), distribución geográfica variada y distintas patologías asociadas, las alteraciones generadas en el transcriptoma atribuibles a HCV podrían ser dependientes de genotipo. Sin embargo, se ha observado un solapamiento sustancial de los transcritos alterados en nuestros sistemas (497/682 transcritos alterados en la misma dirección) con un estudio publicado recientemente en células Huh7.5 infectadas con el virus HJ3-5, un virus quimérico de genotipo 1a/2a (Perez et al. 2019) (GSE103729). Además, en dicho estudio también analizaron Huh7.5 infectadas con virus quiméricos que contienen core-NS2 de los genotipos

2-7 y validaron la expresión diferencial de determinados genes mediante RT-qPCR obteniendo unos perfiles de expresión génica similares entre las células infectadas con los distintos genotipos. Estos datos sugieren que existe un solapamiento entre las alteraciones transcripcionales generadas por HCV con independencia del genotipo y que los resultados principales obtenidos en nuestros sistemas de cultivo celular se pueden extrapolar a otros modelos *in vitro*. No obstante, es importante señalar que los únicos clones moleculares que replican de manera robusta en cultivo celular son los basados en JFH-1 y que únicamente algunos aislados primarios replican en hepatocitos primarios.

### **Nuestros criterios de filtrado y análisis de los datos**

Todos los análisis de los transcritos alterados procedentes del RNA-seq se han basado en la significación estadística ( $FDR \leq 0.05$ ), con independencia del  $\log_2FC$ . Se han considerado válidos todos aquellos transcritos que son estadísticamente significativos, con independencia de la magnitud de cambio, puesto que existe el riesgo de perder información filtrando por la magnitud de cambio, y el objetivo principal de esta tesis es entender el impacto de la infección persistente por HCV sobre el transcriptoma celular, y por tanto implica el análisis de todas aquellas alteraciones estadísticamente significativas y reproducibles, por pequeñas que sean en  $\log_2FC$ .

Este criterio estadístico no puede aplicarse en el contexto de la identificación de genes que vuelven a niveles normales tras el tratamiento, ya que un  $FDR > 0.05$  no asegura que no existan diferencias, sino que impide asegurar que existe una diferencia estadísticamente significativa. Por ello, el criterio empleado para definir un transcrito como normal, se apoya no sólo en un  $FDR > 0.05$  sino que además debe de presentar una desviación máxima de un 15% del valor normal, es decir un valor de  $\log_2FC$  entre -0,2 y +0,2.

### **Relevancia de la información obtenida en el ORA**

En este trabajo se muestra el ORA realizado interrogando la base de datos KEGG-Pathways. Cada transcrito alterado se sitúa en las categorías funcionales en las que tiene un papel descrito, por lo tanto, los mismos transcritos pueden sobrerrepresentar distintas categorías. Como es el caso de NFKBIA que se sitúa en 31 categorías funcionales distintas. Igualmente, es importante remarcar que el ORA únicamente nos permite caracterizar funcionalmente, lo que permite concebir una idea sobre las relaciones entre los dos sistemas de cultivo, y, dentro de cada categoría, entre los transcritos. Todo ello sin analizar si los transcritos que enriquecen una categoría se encuentran inducidos o reprimidos, por lo que el perfil de expresión de cada transcrito que enriquece una categoría podría ser distinto entre un sistema de cultivo y el otro.

Cabe destacar también que existen 12 categorías funcionales asociadas a la infección que se mantienen significativamente enriquecidas tras la eliminación del virus en ambos sistemas. Entre las que se encuentra la categoría “Complement and coagulation cascades”, la cual está estrechamente ligada a hígados con enfermedades crónicas del hígado (Calvaruso et al. 2008). Cabe destacar que los pacientes crónicos de HCV presentan alteraciones en la velocidad de coagulación, principalmente debido al hecho de que muchas de las proteínas implicadas en este proceso se sintetizan en el hígado y junto con otras funciones hepáticas, como la producción de albumina, se ven alteradas a la baja sobre todo en pacientes cirróticos. Cabe señalar que se ha observado que, en pacientes curados con DAAs, que restablecen niveles normales de albúmina tras el tratamiento, siguen presentando una coagulación deficiente (Nielsen et al. 2017). Se podría especular que los resultados obtenidos *in vitro* pudieran reflejar una situación relevante en clínica. En cualquier caso, la funcionalidad del sistema de coagulación se ha propuesto como sistema sustitutivo de evaluación del restablecimiento de la función hepática en pacientes curados virológicamente (Zanetto et al. 2021).

El ORA permite entender mejor las alteraciones que produce el virus en el transcriptoma celular, dado que nos permite observar muchas diferencias posiblemente relevantes, que se manifiestan por cambios pequeños pero consistentes en un conjunto de transcritos, como pueden ser todos aquellos que permanecen alterados en Huh7<sub>DMSO</sub> relacionados con el ciclo celular, y que presentan unos cambios de magnitud pequeños que habrían pasado desapercibidos si se hubiese incluido un criterio de corte por magnitud de la alteración transcriptómica en el análisis.

### **Los transcritos ligados a la infección. Mecanismos fundamentales del virus en cultivo celular.**

Los 682 transcritos alterados durante la infección persistente en ambos sistemas refuerzan la evidencia de que la infección promueve una nueva homeostasis celular. Tras la erradicación de HCV se reducen tanto el número de transcritos alterados (Tabla 4.2) y, por lo tanto, de categorías funcionales sobrerrepresentadas (Figura 4.8B). Esto refuerza una vez más la capacidad de los DAAs de eliminar la infección normalizando en gran medida el transcriptoma de la célula hospedadora tanto en sistemas de cultivo proliferativos como en quiescentes.

Muchas alteraciones, como la inducción de MXA, ISG15 y ATF3, validadas por RT-qPCR (Figura 4.15A) reversion a sus niveles de expresión a niveles basales después del tratamiento con DAAs. Entre estos transcritos destacan los asociados a “MAPK signaling pathway” (DDIT3, DUSP1, GADD45B, HSPB1, JUN, MAP3K1, MAPKAPK3, MRAS, PAL1, PDGFRA, PLA2G4C), una vía de señalización que junto con ERK es activada por las proteínas

virales (Zhao et al. 2005; Hayashi et al. 2000), ligada a importantes funciones celulares como la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis (Dhillon et al. 2007) tras la eliminación del virus la expresión de estos genes se normaliza.

Sin embargo, un número reducido de genes alterados por la infección, permanece desregulado tras el tratamiento y estas alteraciones se mantienen tras tres semanas en ausencia del tratamiento. Dichos genes se han descrito como genes alterados de manera irreversible por HCV, entendiendo el término irreversible dentro del contexto de nuestros modelos experimentales. A diferencia de los firmes cambios asociados a la infección persistente en ambos sistemas de cultivo celular, la erradicación del virus induce un número muy reducido de alteraciones que correlacionen entre los dos modelos experimentales empleados. Únicamente 32 transcritos, el 11% de los transcritos alterados tras la eliminación del virus en Huh7<sub>pro</sub> y el 4% en Huh7<sub>DMSO</sub> se encuentran significativamente desregulados en ambos sistemas. Estos datos sugieren que durante la infección persistente, con independencia del sistema, las alteraciones en el transcriptoma celular muestran cierta similitud. Sin embargo las diferencias entre los dos sistemas de cultivo repercuten en la evolución y recuperación de las células tras la erradicación del virus, incluso entre los genes cuya expresión diferencial correlaciona entre los dos sistemas experimentales.

Existen 6 transcritos de los 682 alterados en ambos modelos experimentales que se mantienen alterados a pesar de que las células están virológicamente curadas (Figura 4.11A). Tres de ellos (UNC13C, UGT2B4 y UGT2B11), se mantienen reprimidos durante y después de la infección persistente en ambos sistemas de cultivo. Pacientes con carcinoma oral de células escamosas (OSCC) presentan expresión reducida de **UNC13C**, implicada en la maduración de las vesículas durante la exocitosis, y para el que recientemente se ha sugerido un papel como supresor de tumores y regulador esencial de la vía de transición epitelio-mesénquima (EMT) durante la progresión del carcinoma oral de células escamosas (OSCC; del inglés *Oral squamous cell carcinoma*)(Velmurugan et al. 2019). Por otro lado, **UGT2B4** y **UGT2B11** pertenecen a la familia UDP glucuronosiltransferasa 2, que cataliza la transferencia de una molécula de ácido glucurónico a una gran variedad de compuestos tóxicos para la célula, a fin de facilitar su eliminación. Entre los sustratos fisiológicos de esta familia de enzimas se encuentran algunas sales biliares. UGT2B4, cuya expresión está regulada a nivel transcriptómico por FXR en respuesta a sales biliares, cataliza la glucuronación de las mismas, por lo que es esencial en la regulación de su metabolismo (Barbier et al. 2003). De hecho, un polimorfismo de UGT2B4 asociado con una reducción en su actividad, se ha asociado con niveles elevados de bilirrubina no conjugada y un riesgo elevado de cáncer de esófago

(Dura et al. 2012). Sería interesante integrar los resultados observados en cultivo celular, donde los transcritos permanecen alterados permanentemente a la baja, en la interpretación de algunos estudios clínicos sobre el impacto de los DAA en la hiperbilirrubinemia de algunos pacientes crónicos de HCV con enfermedad avanzada (Ou et al. 2016).

Otro gen cuya expresión permanece alterada tras la eliminación del virus es **LGR5**, un miembro de la vía de señalización Wnt, implicada inicialmente en procesos de carcinogénesis, pero que se ha revelado esencial para el control de la diferenciación celular, así como en su proliferación y motilidad. La elevación de la expresión de LGR5 en cultivos proliferativos que replican HCV se ha validado a nivel de proteína y se ha comprobado que su expresión se reduce notablemente tras la eliminación de la maquinaria viral (Ali et al. 2011). Los resultados obtenidos en el sistema de infección persistente Huh7<sub>pro</sub> se asemejan a los descritos por Ali et al. Sin embargo, tras la erradicación del virus en células Huh7<sub>DMSO</sub>, la expresión de LGR5 se mantiene elevada. Gracias a la comparación entre los dos sistemas, podemos inferir que la elevación permanente de LGR5 en cultivos proliferativos conlleva una selección negativa a lo largo de los pases, dando lugar a una reducción de la abundancia del transcrito en las poblaciones celulares curadas. En cambio, en cultivos quiescentes, podemos verificar la elevación permanente de este transcrito. Cabe además señalar que la sobreexpresión de LGR5 se ha observado en tejidos tumorales respecto a no tumorales adyacentes en pacientes con HCC y que promueve la metástasis del HCC mediante la inducción de EMT (J. Liu et al. 2017). Además, se ha descrito como marcador de mal pronóstico en pacientes con HCC (Ko et al. 2019), y recientemente LGR5 también se ha descrito como marcador de células iniciadoras de tumores en HCC de ratón (W. Cao et al. 2020).

RABL6 se encuentra inducido durante la infección por HCV en ambos sistemas, a pesar de que en presencia de DMSO las células se encuentran quiescentes, y se mantiene inducido en las Huh7<sub>pro</sub> tras la erradicación del virus, mientras que en Huh7<sub>DMSO</sub> se reducen sus niveles de expresión tras la erradicación del virus. De manera similar al caso de LGR5, interpretamos esta discrepancia en base a los mecanismos de selección presentes en los cultivos proliferativos. En este sentido, la expresión elevada de RABL6 promueve la proliferación celular de tumores neuroendocrinos pancreáticos (Umesalma et al. 2019) y su inducción predice un mal pronóstico en el carcinoma de células escamosas de esófago (Y. Feng et al. 2020), por lo que a pesar de su expresión se encuentra reprimida tras la eliminación del virus, la selección de células con mayor capacidad de proliferación en las poblaciones Huh7<sub>pro</sub>, podría explicar los niveles elevados en las poblaciones curadas. Algo similar sería aplicable a **CTSF**, regulado a la baja en todas las condiciones excepto tras la selección de poblaciones curadas en Huh7<sub>pro</sub>. En células de cáncer gástrico se ha

observado que el silenciamiento de CTSF induce la proliferación e inhibe la apoptosis (Ji et al. 2018).

El perfil de estos genes refuerza la noción de que, si bien existen aspectos comunes en la inducción de alteraciones transcripcionales durante la infección por HCV, la identificación de alteraciones permanentes debidos a la infección en cultivos proliferativos se ve dificultada por fenómenos de selección poblacional que se establecen en dicho modelo (Figura 4.10). No obstante, es posible que existan fenómenos de competición poblacional en el hígado de pacientes infectados. Dicho órgano está sujeto a renovación constante por la eliminación ineficaz de células infectadas, lo cual promueva la selección de subpoblaciones con mayor capacidad proliferativa, un aspecto que se contempla importante en el establecimiento de HCC.

En este sentido, se ha podido verificar la reducción de la expresión de pri-miRNA-122 en nuestros dos sistemas durante la infección (Figura 4.13B). La reducción en la expresión de miRNA-122 es característica de células de HCC (Kutay et al. 2006) (Tsai et al. 2009) y su sobreexpresión causa un efecto opuesto reduciendo la proliferación de células tumorales (S.-C. Wang et al. 2014), inhibiendo el proceso de EMT (Jin et al. 2017). Por lo tanto, la reducción de la expresión de miRNA-122 observada en los modelos de infección, conferiría una ventaja selectiva durante los procesos de competición existentes en las poblaciones proliferativas, no así en las quiescentes. De hecho, la expresión de pri-miRNA-122 parece retornar a niveles normales tras la eliminación del virus en Huh7<sub>DMSO</sub>. Los datos obtenidos en cultivo celular sugerirían que, a pesar de retornar a niveles normales en condiciones donde no se produce selección (Huh7<sub>DMSO</sub>), la ventaja que confiere la expresión reducida de miRNA-122 en Huh7pro, hace que subpoblaciones de células donde miRNA-122 está reducido podrían imponerse. El hecho de que miRNA-122 sea regulado a la baja por HCV se ha planteado como un posible mecanismo de carcinogénesis y los datos presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que, a pesar del tratamiento, subpoblaciones de células anteriormente infectadas, podría contar con una ventaja selectiva e imponerse en un hígado en fase de regeneración constante. Esta ventaja selectiva podría comenzar incluso antes del tratamiento, ya que la reducción de la expresión por miRNA-122 promueve la proliferación (N. Wang et al. 2016).

#### **Datos a nivel de proteínas.**

Dada la profundidad de secuencia que ofrecen los estudios de RNA-seq, ha sido posible obtener una gran cantidad de información inalcanzable por técnicas, tanto de identificación de mRNA como de proteínas. Sin embargo, nuestros resultados no permiten inferir una correlación entre las expresiones de mRNA y proteínas, puesto que es evidente que existen numerosos mecanismos post-transcripcionales, entre ellos la estabilidad y vida media de las

diferentes proteínas o su regulación por modificaciones post-traduccionales (Haider & R. Pal 2013). Muchas de las alteraciones observadas en nuestros análisis durante la replicación activa del virus han sido validados a nivel de proteína por otros autores (Diamond et al. 2010) (Lupberger et al. 2019). También hemos validado la regulación permanente de la expresión de algunos candidatos, como FGB (datos no mostrados). Sin embargo, un análisis conjunto de los datos transcriptómicos y proteómicos puede proporcionar información útil que no se puede descifrar a partir únicamente del análisis individual del RNA-seq, permitiendo analizar la correlación de los cambios de magnitud de los transcritos con los cambios a nivel de proteína.

Debido a las limitaciones técnicas para identificar todas las proteínas (Chandramouli & Qian 2009), sería recomendable realizar un fraccionamiento orientado a enriquecer las proteínas de interés. Este fraccionamiento celular es importante ya que gracias a él se logra reducir la complejidad de un proteoma, mejorando la separación y evitando la superposición de proteínas abundantes, y en consecuencia incrementando considerablemente el número de proteínas identificadas (Hwang et al. 2006). En nuestro caso, sería recomendable realizar el fraccionamiento de las proteínas de citoplasma y núcleo, para poder hacer una análisis integrado con nuestros datos en el sistema de células quiescentes, donde se han podido observar alteraciones permanentes ligadas a la infección por HCV en transcritos relacionados con el ciclo celular y reparación del DNA (Figura 4.17; 4.18). De cualquier manera, las técnicas proteómicas actuales dificultan la cuantificación diferencial de proteínas poco abundantes y quizás el proceso de validación más relevante de las hipótesis elaboradas a partir del RNA-seq sea la validación funcional de aspectos permanentemente alterados.

### **¿Qué hemos aprendido?**

El análisis conjunto de los dos sistemas ha permitido ampliar y reforzar los cambios que ocasiona en el transcriptoma la infección persistente por HCV en cultivo celular. Estos dos sistemas de infección difieren en varios aspectos. En primer lugar el virus empleado presenta diferentes niveles de replicación. En segundo lugar, la infección se ha llevado a cabo a dos multiplicidades diferentes. A pesar de estas diferencias experimentales, hemos podido identificar un conjunto de alteraciones transcriptómicas comunes (Figura 4.10A) que señalan que existe un programa de respuesta a la infección común a ambos sistemas. Sin embargo, queda claro que la resolución de la infección tras el tratamiento con DAAs, difiere notablemente entre los dos sistemas experimentales, incluso entre los transcritos comunes a ambos sistemas. Las diferencias observadas nos informan sobre posibles mecanismos diferenciales de establecimiento de alteraciones permanentes tras la eliminación del virus,

donde el grado de diferenciación y la capacidad proliferativa de los cultivos marcan diferencias fundamentales.

En una interpretación simplista, se podría pensar que el sistema de células quiescentes y parcialmente diferenciadas refleja mejor las alteraciones que podrían ocurrir en un hepatocito infectado por HCV. No obstante, no hay que despreciar el hecho de que la infección crónica por HCV es un proceso dinámico, con un proceso constante de destrucción y regeneración que implica la proliferación de hepatocitos, y la posibilidad de que se establezcan procesos de selección poblacional entre las poblaciones de hepatocitos infectados.

El hígado tiene capacidad regenerativa del 100%, tras la pérdida parcial de tejido (Michalopoulos & Bhushan 2021). Esto implica que también cuando existe una pérdida crónica de hepatocitos, comienzan a generarse situaciones adversas, donde los hepatocitos y colangiocitos, las células epiteliales del conducto biliar, comienzan a funcionar como células madre facultativas que pueden transdiferenciarse. Esta proliferación compulsiva de los hepatocitos supervivientes para compensar el equilibrio hepatostático puede derivar en una neoplasia (Michalopoulos & Bhushan 2021).

Entender cuáles son y cómo se generan las alteraciones permanentes ligadas a la infección en cada uno de nuestros sistemas, nos va a permitir dilucidar cuáles son los hallazgos clave de esta Tesis Doctoral.

Las **células proliferativas**, como se ha mencionado a lo largo de esta discusión, han permitido analizar la coevolución entre las poblaciones y el virus. Resulta llamativo que la mayoría de los transcritos alterados permanentemente (82%) se encuentran alterados en la misma dirección, con cambios de magnitud similares entre las no tratadas y tratadas, a pesar de ser muestras recogidas con seis semanas de diferencia y pasadas dos veces por semana. Estos datos sugieren que existe una selección poblacional que favorece este tipo de perfil transcriptómico en la población.

Es muy posible que la infección por HCV haya favorecido que sea predominante este transcriptoma celular durante las primeras 4 semanas en las que se estableció la infección persistente, antes de comenzar con el tratamiento. Algunos de los transcritos que sostienen esta teoría son los supresores de tumores como miRNA-122 (N. Wang et al. 2016) y miRNA-99 (D. Li et al. 2011), con niveles de expresión a la baja, lo cual favorece la proliferación de las células con este perfil frente al resto. Y no solo supresores de tumores, sino otros transcritos como C8orf4 que se expresan a la baja en HCC (Zhu et al. 2015).

Estos transcritos mencionados anteriormente presentan una situación con predisposición al desarrollo de HCC, sin embargo, también se observan cambios dirigidos a evitar el proceso



de EMT como RASSF6 que se encuentra inducido en nuestro sistema, mientras que se ha publicado que niveles de expresión a la baja promueven EMT (R. Zhou et al. 2017). Al igual que EDIL3 (Gasca et al. 2020) y TDO2 (L. Li et al. 2020), que promueven EMT y se encuentran inducidos en células tumores, mientras que en nuestro sistema se encuentran con niveles de expresión a la baja. Esto demostraría la resiliencia de la población, un “tira y afloja” para encontrar el equilibrio que aumente el fitness de la población a las condiciones experimentales donde se seleccionan poblaciones que proliferen eficazmente.

Puesto que la información que obtenemos del RNA-seq es del conjunto de la población y no estamos analizando de manera individual las células, esta homeostasis podría ser tanto a nivel celular o de población. Sin embargo, en base a otras publicaciones asociadas a la heterogeneidad que se produce dentro de los tumores hepáticos (Zheng et al. 2018) (X. Dong et al. 2021), cabría esperar que dentro de nuestras poblaciones, tanto de las persistentemente infectadas como de las virológicamente curadas, existen subpoblaciones con perfiles transcriptómicos distintos que tendrían que analizarse para más detalle por Single-cell RNA-seq. Esto permitiría así determinar posibles marcadores que se asocien con una tasa baja de supervivencia a HCC.

Además de los transcritos mencionados anteriormente, los niveles de albumina reducidos en sangre se han establecido como posible predictor de riesgo de desarrollar HCC en pacientes virológicamente curados con DAAs y con una enfermedad crónica avanzada en el hígado (Pons et al. 2019) (Verna et al. 2020). A nivel de transcritos, ALB se encuentra alterado significativamente a la baja durante la infección en nuestros dos sistemas, y permanece alterado tras la erradicación del virus en Huh7<sub>pro</sub>. Junto con este transcrito se encuentran también alterados significativamente a la baja FGA, FGB y FGG, siendo el fibrinógeno en sangre el implicado en la coagulación. Todas estas proteínas se sintetizan en el hígado, por lo que alteraciones permanentes en estos transcritos a pesar de la erradicación del virus, si se vieran reflejadas a nivel de proteína, podrían generar cambios en la coagulación complejos (Zanetto et al. 2021).

En las **células quiescentes** es importante remarcar que se encuentran parcialmente diferenciadas y no se dividen, por lo que las células analizadas, y no su progenie, son las que originalmente se infectaron y se encuentran virológicamente curadas. Las mismas células han pasado por las diversas etapas del experimento, adaptándose en cada una de ellas para conseguir la homeostasis celular. Esto no implica que, tras la erradicación del virus, la homeostasis de la célula hospedadora vuelva a la etapa previa a la infección, sino que busca adaptarse a una nueva situación para asegurar su supervivencia tras un estado de estrés prolongado. Por ello, 388 transcritos alterados durante la infección se encuentran

permanentemente alterados tras la erradicación del virus y otros 308 que no se encuentran alterados durante la infección sí lo están después del tratamiento. La aparición de estas alteraciones no asociadas con la infección activa refuerza la idea de que la homeostasis celular no se reestablece a la situación original, sino que la célula curada plantea un nuevo contexto transcripcional celular, de consecuencias fenotípicas desconocidas.

Centrándonos en las secuelas directamente asociadas a HCV, cabe destacar dos subconjuntos de transcritos, uno asociado al ciclo celular y otro en relación con el proceso de EMT. Resulta llamativo observar transcritos alterados permanente asociados al **ciclo celular** en células quiescentes, teniendo en cuenta que son diferencias significativas respecto a las células control que también están en presencia de 2%DMSO, y por tanto quiescentes. Esto confirma lo descrito en otros sistemas experimentales, donde se ha descrito un arresto del ciclo celular de la células hospedadora por la infección por HCV (Higgs et al. 2010) (Kannan et al. 2011). En concreto son 54 los transcritos relacionados con el ciclo celular (ANLN, ASPM, AURKB, BIRC5, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CDC25A, CDC6, CDK1, CDKN3, CENPF, CHEK1, CKAP2, DLGAP5, E2F7, ECT2, FAM83D, FEN1, GINS1, GINS2, HJURP, KIF11, KIF20A, KIF23, KIF4A, KNL1, MAD2L1, MCM2, MCM4, MCM7, MKI67, NCAPG, NDC1, NEK2, NUSAP1, PBK, PCNA, PPP1CC, PRC1, PTTG1, RANBP1, RRM1, RRM2, SMC2, SMC4, STMN1, TACC3, TOP2A, TPX2, TRIM71, UBE2C, ZWILCH, ZWINT). Entre ellos destaca MKi-67, inducido en HCC (C. Yang et al. 2018) y utilizado como marcador de proliferación en HCC (King et al. 1998). MKi-67 junto con MCM4, AURKB y RRM2 se han visto anteriormente en cultivo celular deteniendo el crecimiento en células infectadas con HCV (Walters et al. 2009). Lo inédito de los datos generados en este trabajo es que todos ellos cambian de dirección tras la erradicación del virus. Es decir, se encuentran con niveles de expresión a la baja durante la infección persistente, y tras la erradicación del virus, todos y cada uno de estos transcritos, se expresa al alza. . Estos datos sugieren un cambio muy relevante en la situación en que se encuentran las células tras la erradicación del virus, puesto que los resultados indican que en estas células se podría estar induciendo la proliferación celular. Cabe destacar que si bien la magnitud de cambio es cercana a los límites de detección, la coherencia en el comportamiento de este elevado número de transcritos funcionalmente relacionados permite sostener la hipótesis de que la infección por HCV altera aspectos funcionalmente relevantes del ciclo celular de la célula hospedadora de manera irreversible.

Por otro lado, resulta relevante un subconjunto de 24 transcritos asociados con un conjunto de procesos relacionados con la dediferenciación celular y la capacidad de migración/invasión de células de tipo epitelial conocido como transición epitelio-

mesenquima (EMT; del inglés *epithelial–mesenchymal transition*) (LGR5, ERBB4, TGFB2, PRSS23, ZEB2, THBS1, CDKN2B, LINC00511, MYC, JAG1, HMGCS1, NFE2L2, HIF1A, PROM1, DKK3, CADM1, TGFB2, TGFB1, UNC13C, ERBB2, POU2F1, PDCD4, SOX9, EFNA1, IRF8). Estos transcritos, a diferencia de los asociados a ciclo celular, se mantienen inducidos o reprimidos en la misma dirección que durante la infección persistente. Entre ellos se encuentra LGR5, del que se ha mencionado anteriormente que promueve el proceso de EMT y la metástasis en el carcinoma hepatocelular (J. Liu et al. 2017), y LINC00511 está relacionado con un pronóstico desfavorable en los pacientes con HCC (P. Hu et al. 2019; W.-Y. Hu et al. 2020). Entre este conjunto de transcritos, destaca TFGFB2, por su capacidad transcripcional de regular el proceso de EMT (J. Xu et al. 2009), regulando entre otros a factores de transcripción como ZEB2 (Kahlert et al. 2011). Estos datos permiten especular sobre la posibilidad de que las células quiescentes infectadas por HCV adquieren características de células mesenquimales, favoreciendo su movilidad y su capacidad de invasión y que esta reprogramación celular no es reversible por el tratamiento con DAAs. El proceso de EMT ocurre durante la progresión de HCC (van Zijl et al. 2009) (Giannelli et al. 2016), por lo que la alteración de estos transcritos durante la infección indican una conexión directa de HCV en la transición de hepatocitos a células mesenquimales.

En conjunto, los resultados obtenidos en células quiescentes indican que durante la infección por HCV podría existir un proceso de des-diferenciación de los hepatocitos a células con perfiles EMT junto con una represión del ciclo celular, evitando así la proliferación. Sin embargo, tras la erradicación del virus las células se encuentran en unas circunstancias que además de favorecer los procesos de EMT, se promueven los procesos asociados al ciclo celular y la proliferación. Estos cambios transcripcionales podrían no darse en todas las células, pero sería suficiente con que un pequeño número de células portara este perfil transcriptómico alterado para favorecer el desarrollo de células precancerosas. Teniendo en cuenta la hipótesis de partida de que la sobresaliente eficacia de los tratamientos por DAAs pueda limitar la eliminación de hepatocitos que han estado expuestos a la infección persistente por HCV (Intro XX), nuestros datos señalan que la reprogramación irreversible de células infectadas por HCV podría facilitar eventos que lleven a nuevas formas de oncogénesis por la infección crónica por HCV, no reversibles por el tratamiento tal y como se ha sugerido en base a la aparición de formas agresivas de ocurrencia y recurrencia de HCC en pacientes curados (PMID 33741640).

## 6. CONCLUSIONES

1. La infección persistente por el virus de la hepatitis C puede ser erradicada de cultivos celulares mediante el tratamiento con combinaciones de antivirales de acción directa.
2. La infección persistente por HCV provoca alteraciones transcripcionales en la célula hospedadora, tanto en el sistema de cultivo celular proliferativo como en el quiescente, preservando su viabilidad y supervivencia. Estos cambios están asociados a vías de señalización en respuesta a la infección y a vías metabólicas esenciales para la replicación del virus.
3. Tras la erradicación de la infección, la mayor parte de las alteraciones transcripcionales asociadas a la replicación viral persistente se normalizan en ambos sistemas de cultivo celular. Sin embargo, el transcriptoma de las células virológicamente curadas con antivirales de acción directa no es idéntico al de las células no infectadas, sugiriendo que existen transcritos irreversiblemente alterados por la infección persistente por HCV.
4. El estudio simultáneo de los dos modelos *in vitro* de infección persistente indica que existen alteraciones transcripcionales directamente inducidas por el virus que se observan en ambos sistemas. No obstante, la respuesta al tratamiento es dependiente del sistema de estudio empleado, lo que sugiere que existen diversos mecanismos por los que se establecen dichas modificaciones después de la eliminación del virus.
5. Estos mecanismos incluyen la selección de poblaciones celulares de mayor fitness en las distintas condiciones experimentales que emergen por la presión selectiva ejercida por la infección, el tratamiento con antivirales y sus efectos diferenciales sobre poblaciones infectadas y no infectadas. También se han identificado alteraciones que no requieren la selección de poblaciones celulares y que se establecen de manera irreversible en la célula hospedadora por mecanismos de acción directa de la infección por HCV.
6. Transcritos desregulados en ambos sistemas de cultivo celular durante la infección persistente correlacionan con las alteraciones transcripcionales observadas en biopsias hepáticas de pacientes con infección crónica por HCV y permite elaborar hipótesis a validar en clínica sobre alteraciones irreversibles en hepatocitos previamente infectados remanentes en el paciente curado.

7. En el modelo de infección de células quiescentes se han observado alteraciones transcripcionales irreversibles tras la eliminación del virus que presentan un patrón transcriptómico compatible con modificaciones epigenéticas observadas en biopsias de hígado de pacientes con respuesta virológica sostenida mediada por DAAs, sugiriendo que algunas de estas alteraciones surgen directamente de la interacción virus-hospedador.
8. Los modelos generados de infección-eliminación en cultivo celular constituyen una herramienta útil para la identificación de biomarcadores, fundamentales para analizar el grado de alteración del hígado en el que se ha eliminado la infección, permitiendo un mejor seguimiento y clasificación de los pacientes para la prevención del carcinoma hepatocelular, una patología asociada a HCV incluso tras la curación virológica.

## 7. REFERENCIAS

- Abby Philips, C. et al., 2019. A Novel Phosphoinositide-3-kinase Adapter Protein 1 Gene Missense Mutation in Familial Cirrhosis. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 9(5), pp.652–656.
- Afdhal, N. et al., 2014. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine*, 370(20), pp.1889–1898.
- Ali, N. et al., 2011. Hepatitis C virus-induced cancer stem cell-like signatures in cell culture and murine tumor xenografts. *Journal of Virology*, 85(23), pp.12292–12303.
- Amako, Y. et al., 2009. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, 83(18), pp.9237–9246.
- Anders, S., Pyl, P.T. & Huber, W., 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), pp.166–169.
- Andre, P. et al., 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *Journal of Virology*, 76(14), pp.6919–6928.
- Barbier, O. et al., 2003. FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology*, 124(7), pp.1926–1940.
- Bartenschlager, R., 2002. Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(11), pp.911–916.
- Bartenschlager, R. et al., 2011. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology*, 19(2), pp.95–103.
- Bauhofer, O. et al., 2012. Persistence of HCV in quiescent hepatic cells under conditions of an interferon-induced antiviral response. *Gastroenterology*, 143(2), pp.429–38.e8.
- Benedicto, I. et al., 2015. Clathrin mediates infectious hepatitis C virus particle egress. *Journal of Virology*, 89(8), pp.4180–4190.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B Methodological*, 125(1-2), pp.279–284.
- Benjamini, Y. & Yekutieli, D., 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *The Annals of Statistics*, 29(4), pp.1165–1188.
- Berger, C. et al., 2014. Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication. *Gastroenterology*, 147(5), pp.1094–1105.e25.
- Berger, K.L. et al., 2011. Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *Journal of Virology*, 85(17), pp.8870–8883.

- Berger, K.L. et al., 2009. Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), pp.7577–7582.
- Blanchard, E. et al., 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 80(14), pp.6964–6972.
- Blight, K.J., McKeating, J.A. & Rice, C.M., 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology*, 76(24), pp.13001–13014.
- Bochman, M.L. & Schwacha, A., 2009. The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(4), pp.652–683.
- Boldanova, T. et al., 2017. Transcriptional response to hepatitis C virus infection and interferon-alpha treatment in the human liver. *EMBO Molecular Medicine*, 9(6), pp.816–834.
- Bradshaw, D., Matthews, G. & Danta, M., 2013. Sexually transmitted hepatitis C infection: The new epidemic in MSM? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26(1), pp.66–72.
- Burbelo, P.D. et al., 2012. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *Journal of Virology*, 86(11), pp.6171–6178.
- Calo, E. & Wysocka, J., 2013. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Molecular Cell*, 49(5), pp.825–837.
- Calvaruso, V. & Craxì, A., 2020. Hepatic benefits of HCV cure. *Journal of Hepatology*, 73(6), pp.1548–1556.
- Calvaruso, V. et al., 2008. Coagulation and fibrosis in chronic liver disease. *Gut*, 57(12), pp.1722–1727.
- Cao, J. et al., 2018. Targeting glypican-4 overcomes 5-FU resistance and attenuates stem cell-like properties via suppression of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in pancreatic cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(11), pp.9498–9512.
- Cao, W. et al., 2020. LGR5 marks targetable tumor-initiating cells in mouse liver cancer. *Nature Communications*, 11(1), pp.1961–16.
- Cardoso, H. et al., 2016. High incidence of hepatocellular carcinoma following successful interferon-free antiviral therapy for hepatitis C associated cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 65(5), pp.1070–1071.
- Carnero, E. et al., 2016. Long noncoding RNA EGOT negatively affects the antiviral response and favors HCV replication. *EMBO Reports*, 17(7), pp.1013–1028.
- Castelli, R. et al., 2016. High prevalence of splenic marginal zone lymphoma among patients with acquired C1 inhibitor deficiency. *British journal of haematology*, 172(6), pp.902–

- Castro, V., Ávila-Pérez, G., et al., 2019. A Cell Culture Model for Persistent HCV Infection. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1911(Chapter 10), pp.157–168.
- Castro, V., Calvo, G., et al., 2019. Differential Roles of Lipin1 and Lipin2 in the Hepatitis C Virus Replication Cycle. *Cells*, 8(11).
- Chandramouli, K. & Qian, P.-Y., 2009. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Human genomics and proteomics : HGP*, 2009.
- Chen, J., Gingold, J.A. & Su, X., 2019. Immunomodulatory TGF- $\beta$  Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Trends in molecular medicine*, 25(11), pp.1010–1023.
- Choi, S. et al., 2009. Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 39(3), pp.205–217.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), pp.156–159.
- Choo, Q.L. et al., 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), pp.359–362.
- Chusri, P. et al., 2016. HCV induces transforming growth factor  $\beta$ 1 through activation of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Scientific Reports*, 6(1), pp.22487–13.
- Conte, I. et al., 2009. Synthesis and SAR of piperazinyl-N-phenylbenzamides as inhibitors of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(6), pp.1779–1783.
- Conti, F. et al., 2016. Early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in HCV-related cirrhosis treated with direct-acting antivirals. *Journal of Hepatology*, 65(4), pp.727–733.
- Czaja, A.J. et al., 1998. Host- and disease-specific factors affecting steatosis in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 29(2), pp.198–206.
- Dang, H. et al., 2020. LINC01419 promotes cell proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by enhancing NDRG1 promoter activity. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 43(5), pp.931–947.
- Degos, F. et al., 2000. Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut*, 47(1), pp.131–136.
- Denolly, S. et al., 2019. A serum protein factor mediates maturation and apoB-association of HCV particles in the extracellular milieu. *Journal of Hepatology*, 70(4), pp.626–638.



- Dharancy, S. et al., 2005. Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 128(2), pp.334–342.
- Dhillon, A.S. et al., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), pp.3279–3290.
- Diamond, D.L. et al., 2012. Proteome and computational analyses reveal new insights into the mechanisms of hepatitis C virus-mediated liver disease posttransplantation. *Hepatology*, 56(1), pp.28–38.
- Diamond, D.L. et al., 2010. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathogens*, 6(1), p.e1000719.
- Dong, B. et al., 2012. Targeting A20 enhances TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 418(2), pp.433–438.
- Dong, X. et al., 2021. Single-cell analysis reveals the intra-tumor heterogeneity and identifies MLXIPL as a biomarker in the cellular trajectory of hepatocellular carcinoma. *Cell death discovery*, 7(1), pp.14–13.
- Douam, F., Lavillette, D. & Cosset, F.L., 2015. The mechanism of HCV entry into host cells. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. pp. 63–107.
- Dubuisson, J., Helle, F. & Cocquerel, L., 2008. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cellular Microbiology*, 10(4), pp.821–827.
- Dunkelberger, J.R. & Song, W.-C., 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), pp.34–50.
- Dura, P. et al., 2012. High enzyme activity UGT1A1 or low activity UGT1A8 and UGT2B4 genotypes increase esophageal cancer risk. *International journal of oncology*, 40(6), pp.1789–1796.
- Emmrich, S. et al., 2014. LincRNAs MONC and MIR100HG act as oncogenes in acute megakaryoblastic leukemia. *Molecular Cancer*, 13(1), pp.171–12.
- European Association For The Study Of The LiverEuropean Organisation For Research And Treatment Of Cancer, 2012. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56(4), pp.908–943.
- Falade-Nwulia, O. et al., 2017. Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review. *Annals of internal medicine*, 166(9), pp.637–648.
- Feinstone, S.M. et al., 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *The New England journal of medicine*, 292(15), pp.767–770.
- Feld, J.J. & Hoofnagle, J.H., 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, 436(7053), pp.967–972.

- Feng, M.-X. et al., 2014. Elevated autocrine EDIL3 protects hepatocellular carcinoma from anoikis through RGD-mediated integrin activation. *Molecular Cancer*, 13(1), pp.226–17.
- Feng, Y. et al., 2020. High expression of RABL6 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC cancer*, 20(1), pp.602–10.
- Ferrín, G. et al., 2015. Plasma Protein Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma in HCV-Infected Alcoholic Patients with Cirrhosis I. A. Chemin, ed. *PLoS ONE*, 10(3), pp.e0118527–14.
- Fried, M.W. et al., 2013. Once-daily simeprevir (TMC435) with pegylated interferon and ribavirin in treatment-naïve genotype 1 hepatitis C: the randomized PILLAR study. *Hepatology*, 58(6), pp.1918–1929.
- Friesland, M. et al., 2013. Sigma-1 receptor regulates early steps of viral RNA replication at the onset of hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, 87(11), pp.6377–6390.
- Gao, M. et al., 2010. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature*, 465(7294), pp.96–100.
- Gasca, J. et al., 2020. EDIL3 promotes epithelial-mesenchymal transition and paclitaxel resistance through its interaction with integrin  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  in cancer cells. *Cell death discovery*, 6, p.86.
- Gastaminza, P. et al., 2010. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *Journal of Virology*, 84(21), pp.10999–11009.
- Gastaminza, P., Kapadia, S.B. & Chisari, F.V., 2006. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *Journal of Virology*, 80(22), pp.11074–11081.
- Giannelli, G. et al., 2016. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 65(4), pp.798–808.
- Glue, P. et al., 2000. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 68(5), pp.556–567.
- Goossens, N. & Hoshida, Y., 2015. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Clinical and molecular hepatology*, 21(2), pp.105–114.
- Goto, K. et al., 2020. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: When the Host Loses Its Grip. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), p.3057.
- Guedj, J. & Perelson, A.S., 2011. Second-phase hepatitis C virus RNA decline during telaprevir-based therapy increases with drug effectiveness: implications for treatment duration. *Hepatology*, 53(6), pp.1801–1808.
- Guo, Y. et al., 2019. LncRNA DLEU2 aggravates the progression of hepatocellular

- carcinoma through binding to EZH2. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 118, p.109272.
- Haider, S. & Pal, R., 2013. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Current genomics*, 14(2), pp.91–110.
- Hamdane, N. et al., 2019. HCV-Induced Epigenetic Changes Associated With Liver Cancer Risk Persist After Sustained Virologic Response. *Gastroenterology*, 156(8), pp.2313–2329.e7.
- Hammond, G.R.V. et al., 2012. PI4P and PI(4,5)P<sub>2</sub> are essential but independent lipid determinants of membrane identity. *Science*, 337(6095), pp.727–730.
- Haqshenas, G. et al., 2017. Signalome-wide assessment of host cell response to hepatitis C virus. *Nature Communications*, 8, p.15158.
- Hartlage, A.S., Cullen, J.M. & Kapoor, A., 2016. The Strange, Expanding World of Animal Hepaciviruses. *Annual review of virology*, 3(1), pp.53–75.
- Hashimoto, K. et al., 2004. Analysis of DNA copy number aberrations in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinomas by conventional CGH and array CGH. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 17(6), pp.617–622.
- Hayashi, J. et al., 2000. Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology*, 32(5), pp.958–961.
- Heim, M.H. & Thimme, R., 2014. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *Journal of Hepatology*, 61(1 Suppl), pp.S14–25.
- Herker, E. & Ott, M., 2011. Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(6), pp.241–248.
- Herker, E. et al., 2010. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nature Medicine*, 16(11), pp.1295–1298.
- Higgs, M.R., Lerat, H. & Pawlotsky, J.-M., 2010. Downregulation of Gadd45beta expression by hepatitis C virus leads to defective cell cycle arrest. *Cancer research*, 70(12), pp.4901–4911.
- Ho, A.-S. et al., 2010. Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. *Journal of biomedical science*, 17(1), pp.58–7.
- Hourigan, L.F. et al., 1999. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology*, 29(4), pp.1215–1219.
- Hsu, S.-J., Yang, S.-S. & Kao, J.-H., 2019. Risk of hepatocellular carcinoma development after hepatitis C virus eradicated by direct-acting antivirals: Fact or fiction? *Journal of the*

- Hu, P. et al., 2019. Linc00511 Indicates A Poor Prognosis Of Liver Hepatocellular Carcinoma. *OncoTargets and therapy*, 12, pp.9367–9376.
- Hu, W.-Y. et al., 2020. LINC00511 as a ceRNA promotes cell malignant behaviors and correlates with prognosis of hepatocellular carcinoma patients by modulating miR-195/EYA1 axis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 121, p.109642.
- Huang, H., Chen, Y. & Ye, J., 2007. Inhibition of hepatitis C virus replication by peroxidation of arachidonate and restoration by vitamin E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), pp.18666–18670.
- Hwang, S.-I. et al., 2006. Systematic characterization of nuclear proteome during apoptosis: a quantitative proteomic study by differential extraction and stable isotope labeling. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5(6), pp.1131–1145.
- Ioannou, G.N. & Feld, J.J., 2019. What Are the Benefits of a Sustained Virologic Response to Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection? *Gastroenterology*, 156(2), pp.446–460.e2.
- Jacobson, I.M. et al., 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*, 364(25), pp.2405–2416.
- Ji, C. et al., 2018. Cathepsin F Knockdown Induces Proliferation and Inhibits Apoptosis in Gastric Cancer Cells. *Oncology research*, 26(1), pp.83–93.
- Jin, Y. et al., 2017. MiR-122 inhibits epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by targeting Snail1 and Snail2 and suppressing WNT/ $\beta$ -cadherin signaling pathway. *Experimental cell research*, 360(2), pp.210–217.
- Jirasko, V. et al., 2010. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathogens*, 6(12), p.e1001233.
- Jones, C.T. et al., 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *Journal of Virology*, 81(16), pp.8374–8383.
- Joo, M. et al., 2005. Hepatitis C virus core protein suppresses NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with IkappaB kinase beta. *Journal of Virology*, 79(12), pp.7648–7657.
- Kahlert, C. et al., 2011. Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in Vitro. *Clinical Cancer Research*, 17(24), pp.7654–7663.
- Kannan, R.P. et al., 2011. Hepatitis C virus infection causes cell cycle arrest at the level of initiation of mitosis. *Journal of Virology*, 85(16), pp.7989–8001.

- Kato, T. et al., 2001. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *Journal of medical virology*, 64(3), pp.334–339.
- Ke, R. et al., 2018. Superinfection and cure of infected cells as mechanisms for hepatitis C virus adaptation and persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(30), pp.E7139–E7148.
- Khan, I. et al., 2014. Modulation of hepatitis C virus genome replication by glycosphingolipids and four-phosphate adaptor protein 2. *Journal of Virology*, 88(21), pp.12276–12295.
- King, K.L. et al., 1998. Ki-67 expression as a prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 13(3), pp.273–279.
- Ko, C.-J. et al., 2019. Overexpression of LGR-5 as a predictor of poor outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(10), p.1836.
- Kuo, G. et al., 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, 244(4902), pp.362–364.
- Kutay, H. et al., 2006. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(3), pp.671–678.
- Kvarnhammar, A.M., Petterson, T. & Cardell, L.-O., 2011. NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in human eosinophils: activation by NOD1 and NOD2 agonists. *Immunology*, 134(3), pp.314–325.
- Lan, Y. et al., 2018. STK17B promotes carcinogenesis and metastasis via AKT/GSK-3 $\beta$ /Snail signaling in hepatocellular carcinoma. *Cell death & disease*, 9(2), pp.236–13.
- Lange, C.M. et al., 2014. Emerging therapies for the treatment of hepatitis C. *EMBO Molecular Medicine*, 6(1), pp.4–15.
- Langmead, B. et al., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), pp.R25–10.
- Law, M. et al., 2008. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nature Medicine*, 14(1), pp.25–27.
- Lee, J. et al., 2019. Hepatitis C Virus Induces the Ubiquitin-Editing Enzyme A20 via Depletion of the Transcription Factor Upstream Stimulatory Factor 1 To Support Its Replication. X.-J. Meng, ed. *mBio*, 10(4).
- Lee, J.-Y. et al., 2019. Spatiotemporal Coupling of the Hepatitis C Virus Replication Cycle by Creating a Lipid Droplet- Proximal Membranous Replication Compartment. *Cell Reports*, 27(12), pp.3602–3617.e5.
- Lemm, J.A. et al., 2010. Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors. *Journal of*

- Virology*, 84(1), pp.482–491.
- Lerat, H. et al., 2009. Hepatitis C virus proteins induce lipogenesis and defective triglyceride secretion in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 284(48), pp.33466–33474.
- Lerat, H. et al., 2002. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology*, 122(2), pp.352–365.
- Lerner, M. et al., 2009. DLEU2, frequently deleted in malignancy, functions as a critical host gene of the cell cycle inhibitory microRNAs miR-15a and miR-16-1. *Experimental cell research*, 315(17), pp.2941–2952.
- Li, D. et al., 2011. MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), pp.36677–36685.
- Li, H. et al., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), pp.2078–2079.
- Li, L. et al., 2020. TDO2 Promotes the EMT of Hepatocellular Carcinoma Through Kyn-AhR Pathway. *Frontiers in oncology*, 10, p.562823.
- Liao, H.-T. et al., 2018. Identification of The Aberrantly Expressed LncRNAs in Hepatocellular Carcinoma: A Bioinformatics Analysis Based on RNA-sequencing. *Scientific Reports*, 8(1), p.5395.
- Link, J.O. et al., 2014. Discovery of ledipasvir (GS-5885): a potent, once-daily oral NS5A inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *Journal of medicinal chemistry*, 57(5), pp.2033–2046.
- Liu, H.M. & Gale, M., 2010. Hepatitis C Virus Evasion from RIG-I-Dependent Hepatic Innate Immunity. *Gastroenterology research and practice*, 2010, p.548390.
- LIU, J. et al., 2015. Computational networks of activating transcription factor 3 gene in Huh7 cell lines and hepatitis C virus-infected Huh7 cell lines. *Molecular medicine reports*, 12(1), pp.1239–1246.
- Liu, J. et al., 2017. LGR5 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*, 8(31), pp.50896–50903.
- Liu, S. et al., 2009. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *Journal of Virology*, 83(4), pp.2011–2014.
- Liu, Z. et al., 2012. Transient activation of the PI3K-AKT pathway by hepatitis C virus to enhance viral entry. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), pp.41922–41930.
- Llovet, J.M. et al., 2016. Hepatocellular carcinoma. *Nature reviews. Disease primers*, 2, p.16018.

- Lohmann, V. et al., 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285(5424), pp.110–113.
- Lok, A.S. et al., 2009. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*, 136(1), pp.138–148.
- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), p.550.
- Luna, J.M. et al., 2015. Hepatitis C Virus RNA Functionally Sequesters miR-122. *Cell*, 160(6), pp.1099–1110.
- Lupberger, J. et al., 2019. Combined Analysis of Metabolomes, Proteomes, and Transcriptomes of Hepatitis C Virus–Infected Cells and Liver to Identify Pathways Associated With Disease Development. *Gastroenterology*, 157(2), pp.537–551.e9.
- Machida, K. et al., 2004. Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. *Journal of Virology*, 78(16), pp.8835–8843.
- Machida, K. et al., 2010. Hepatitis C virus inhibits DNA damage repair through reactive oxygen and nitrogen species and by interfering with the ATM-NBS1/Mre11/Rad50 DNA repair pathway in monocytes and hepatocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(11), pp.6985–6998.
- Mackenzie, P.I., Rodbourne, L. & Stranks, S., 1992. Steroid UDP glucuronosyltransferases. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 43(8), pp.1099–1105.
- Mankouri, J. et al., 2016. Release of Infectious Hepatitis C Virus from Huh7 Cells Occurs via a trans-Golgi Network-to-Endosome Pathway Independent of Very-Low-Density Lipoprotein Secretion. *Journal of Virology*, 90(16), pp.7159–7170.
- Manns, M.P. et al., 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *The Lancet*, 358(9286), pp.958–965.
- Manns, M.P., Wedemeyer, H. & Cornberg, M., 2006. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*, 55(9), pp.1350–1359.
- Mariño, Z. et al., 2019. Time association between hepatitis C therapy and hepatocellular carcinoma emergence in cirrhosis: relevance of non-characterized nodules. *Journal of Hepatology*, pp.1–51.
- McHutchison, J.G. et al., 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *The New England journal of medicine*, 339(21), pp.1485–1492.
- McLauchlan, J., 2009. Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), pp.552–559.

- Menzel, N. et al., 2012. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious Hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens*, 8(7), p.21.
- Merquiol, E. et al., 2011. HCV causes chronic endoplasmic reticulum stress leading to adaptation and interference with the unfolded protein response. *PLoS ONE*, 6(9), p.e24660.
- Merz, A. et al., 2011. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *Journal of Biological Chemistry*, 286(4), pp.3018–3032.
- Messina, J.P. et al., 2015. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 61(1), pp.77–87.
- Meyers, N.L. et al., 2016. Entangled in a membranous web: ER and lipid droplet reorganization during hepatitis C virus infection. *Current Opinion in Cell Biology*, 41, pp.117–124.
- Michalopoulos, G.K. & Bhushan, B., 2021. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(1), pp.40–55.
- Milward, A., Mankouri, J. & Harris, M., 2010. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with beta-catenin and stimulates its transcriptional activity in a phosphoinositide-3 kinase-dependent fashion. *Journal of General Virology*, 91(Pt 2), pp.373–381.
- Mingorance, L. et al., 2018. Host phosphatidic acid phosphatase lipin1 is rate limiting for functional hepatitis C virus replicase complex formation. *PLoS Pathogens*, 14(9), p.e1007284.
- Mitchell, J.K. et al., 2017. Hepatitis C Virus Indirectly Disrupts DNA Damage-Induced p53 Responses by Activating Protein Kinase R. *mBio*, 8(2).
- Miyanari, Y. et al., 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology*, 9(9), pp.1089–1097.
- Moradpour, D. & Penin, F., 2013. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Current topics in microbiology and immunology*, 369, pp.113–142.
- Moradpour, D., Penin, F. & Rice, C.M., 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*, 5(6), pp.453–463.
- Moriya, K. et al., 1997. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *Journal of General Virology*, 78(7), pp.1527–1531.
- Moriya, K. et al., 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Medicine*, 4(9), pp.1065–1067.
- Nakabayashi, H. et al., 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated



- functions in chemically defined medium. *Cancer research*, 42(9), pp.3858–3863.
- Negro, F., 2009. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatitis C virus-induced insulin resistance. *PPAR research*, 2009, p.483485.
- Nelson, D.R. et al., 2015. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology*, 61(4), pp.1127–1135.
- Nelson, P.K. et al., 2011. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: Results of systematic reviews. *The Lancet*, 378(9791), pp.571–583.
- Neufeldt, C.J. et al., 2018. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), pp.125–142.
- Neumann, A.U. et al., 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*, 282(5386), pp.103–107.
- Nguyen, T.T.T. et al., 2018. Nonstructural Protein 5A Impairs DNA Damage Repair: Implications for Hepatitis C Virus-Mediated Hepatocarcinogenesis. *Journal of Virology*, 92(11).
- Nielsen, N.S. et al., 2017. Impaired Platelet Aggregation and Rebalanced Hemostasis in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), p.1016.
- Oem, J.K. et al., 2008. Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2. *Journal of General Virology*, 89(5), pp.1225–1230.
- Ohata, K. et al., 2003. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer*, 97(12), pp.3036–3043.
- Otsuka, M. et al., 2002. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology*, 296(1), pp.84–93.
- Ou, P., Li, F. & Chen, J., 2016. New Direct-Acting Antiviral Agents Can Be Hepatotoxic in Patients With Hepatitis C Virus Infection and Decompensated Cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(11), pp.1669–1671.
- Pal, S. et al., 2010. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25(3), pp.627–634.
- Park, J. et al., 2012. Hepatitis C virus infection enhances TNF $\alpha$ -induced cell death via suppression of NF- $\kappa$ B. *Hepatology*, 56(3), pp.831–840.
- Paul, D. & Bartenschlager, R., 2015a. A sensor at the lipid-protein interface: lipid peroxidation controls hepatitis C virus replication. *Hepatology*, 61(3), pp.1083–1085.

- Paul, D. & Bartenschlager, R., 2015b. Flaviviridae Replication Organelles: Oh, What a Tangled Web We Weave. *Annual review of virology*, 2(1), pp.289–310.
- Pawlotsky, J.-M. et al., 2004. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 126(3), pp.703–714.
- Pawlotsky, J.-M. et al., 2015. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *Journal of Hepatology*, 62(S1), pp.S87–S99.
- Pellicoro, A. et al., 2014. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature reviews. Immunology*, 14(3), pp.181–194.
- Perelson, A.S. & Guedj, J., 2015. Modelling hepatitis C therapy--predicting effects of treatment. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 12(8), pp.437–445.
- Perez, S. et al., 2019. Hepatitis C virus leaves an epigenetic signature post cure of infection by direct-acting antivirals. *PLoS Genetics*, 15(6), p.e1008181.
- Pérez-Berná, A.J. et al., 2016. Structural Changes in Cells Imaged by Soft X-ray Cryo-Tomography during Hepatitis C Virus Infection. *ACS Nano*, 10(7), pp.6597–6611.
- Pianko, S. & McHutchison, J.G., 2000. Treatment of hepatitis C with interferon and ribavirin. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 15(6), pp.581–586.
- Ploss, A. & Evans, M.J., 2012. Hepatitis C virus host cell entry. *Current Opinion in Virology*, 2(1), pp.14–19.
- Ploss, A. et al., 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, 457(7231), pp.882–886.
- Pons, M. et al., 2019. Non-invasive prediction of liver related events in HCV compensated advanced chronic liver disease patients after oral antivirals. *Journal of Hepatology*.
- Poordad, F. et al., 2011. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *The New England journal of medicine*, 364(13), pp.1195–1206.
- Popescu, C.-I. et al., 2014. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology*, 3(4), pp.892–921.
- Prada, A.E., Zahedi, K. & Davis, A.E., 1998. Regulation of C1 inhibitor synthesis. *Immunobiology*, 199(2), pp.377–388.
- Pybus, O.G. & Thézé, J., 2016. Hepacivirus cross-species transmission and the origins of the hepatitis C virus. *Current Opinion in Virology*, 16, pp.1–7.
- Rahajeng, J. et al., 2019. Efficient Golgi Forward Trafficking Requires GOLPH3-Driven, PI4P-Dependent Membrane Curvature. *Developmental Cell*, 50(5), pp.573–585.e5.
- Rakic, B. et al., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha antagonism inhibits hepatitis C virus replication. *Chemistry & biology*, 13(1), pp.23–30.

- Ravi, S. et al., 2017. Unusually High Rates of Hepatocellular Carcinoma After Treatment With Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Related Cirrhosis. *Gastroenterology*, 152(4), pp.911–912.
- Reig, M. et al., 2016. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *Journal of Hepatology*, 65(4), pp.719–726.
- Reiss, S. et al., 2011. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host and Microbe*, 9(1), pp.32–45.
- Ress, C. & Kaser, S., 2016. Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World Journal of Gastroenterology*, 22(4), pp.1664–1673.
- Ríos-Ocampo, W.A. et al., 2020. Hepatitis C Virus Proteins Core and NS5A Are Highly Sensitive to Oxidative Stress-Induced Degradation after eIF2 $\alpha$ /ATF4 Pathway Activation. *Viruses*, 12(4), p.425.
- Rižner, T.L. & Penning, T.M., 2014. Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids*, 79, pp.49–63.
- Ríos-Ocampo, W.A. et al., 2019. The cellular stress response in hepatitis C virus infection: A balancing act to promote viral persistence and host cell survival. *Virus Research*, 263, pp.1–8.
- Roberts, H.R. & Cederbaum, A.I., 1972. The liver and blood coagulation: physiology and pathology. *Gastroenterology*, 63(2), pp.297–320.
- Robinson, J.T. et al., 2011. Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology*, 29(1), pp.24–26.
- Rodriguez-Torres, M. et al., 2013. Sofosbuvir (GS-7977) plus peginterferon/ribavirin in treatment-naïve patients with HCV genotype 1: a randomized, 28-day, dose-ranging trial. *Journal of Hepatology*, 58(4), pp.663–668.
- Romero-Brey, I. et al., 2015. NS5A Domain 1 and Polyprotein Cleavage Kinetics Are Critical for Induction of Double-Membrane Vesicles Associated with Hepatitis C Virus Replication. *mBio*, 6(4), p.e00759.
- Romero-Brey, I. et al., 2012. Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathogens*, 8(12), p.e1003056.
- Rubbia-Brandt, L. et al., 2000. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *Journal of Hepatology*, 33(1), pp.106–115.
- Ryerson, A.B. et al., 2020. Vital Signs: Newly Reported Acute and Chronic Hepatitis C Cases - United States, 2009-2018. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 69(14), pp.399–404.

- Sagnelli, E. et al., 2021. Impact of DAA-Based Regimens on HCV-Related Extra-Hepatic Damage: A Narrative Review. *Advances in experimental medicine and biology*, 1323, pp.115–147.
- Sainz, B. & Chisari, F.V., 2006. Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells. *Journal of Virology*, 80(20), pp.10253–10257.
- Sanduzzi-Zamparelli, M. et al., 2019. Hepatocellular Carcinoma Recurrence in HCV Patients Treated with Direct Antiviral Agents. *Viruses*, 11(5), pp.406–13.
- Sasaki, R. et al., 2018. Hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma after sustained virologic response. *World Journal of Hepatology*, 10(12), pp.898–906.
- Scheel, T.K.H. & Rice, C.M., 2013. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature Medicine*, 19(7), pp.837–849.
- Seitz, A.K. et al., 2017. Profiling of long non-coding RNAs identifies LINC00958 and LINC01296 as candidate oncogenes in bladder cancer. *Scientific Reports*, 7(1), p.395.
- Shi, Q., Hoffman, B. & Liu, Q., 2016. PI3K-Akt signaling pathway upregulates hepatitis C virus RNA translation through the activation of SREBPs. *Virology*, 490, pp.99–108.
- Sigon, G. et al., 2019. Procoagulant imbalance influences cardiovascular and liver damage in chronic hepatitis C independently of steatosis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 39(12), pp.2309–2316.
- Simmonds, P., 2013. The origin of hepatitis C virus. *Current topics in microbiology and immunology*, 369, pp.1–15.
- Singal, A.G. et al., 2013. Detection of hepatocellular carcinoma at advanced stages among patients in the HALT-C trial: where did surveillance fail? *The American journal of gastroenterology*, 108(3), pp.425–432.
- Sofia, M.J. et al., 2010. Discovery of a  $\beta$ -d-2'-deoxy-2'- $\alpha$ -fluoro-2'- $\beta$ -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *Journal of medicinal chemistry*, 53(19), pp.7202–7218.
- Sogawa, K. et al., 2013. Serum fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa fragment as a biomarker for early detection of hepatic fibrosis related to hepatitis C virus. *Proteomics. Clinical applications*, 7(5-6), pp.424–431.
- Stone, J. et al., 2018. Incarceration history and risk of HIV and hepatitis C virus acquisition among people who inject drugs: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(12), pp.1397–1409.
- Stöckel, D. et al., 2016. Multi-omics enrichment analysis using the GeneTrail2 web service. *Bioinformatics*, 32(10), pp.1502–1508.
- Street, A. et al., 2005. Hepatitis C virus NS5A-mediated activation of phosphoinositide 3-

- kinase results in stabilization of cellular beta-catenin and stimulation of beta-catenin-responsive transcription. *Journal of Virology*, 79(8), pp.5006–5016.
- Sulkowski, M.S. et al., 2014. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *The New England journal of medicine*, 370(3), pp.211–221.
- Takacs, C.N. et al., 2017. Differential Regulation of Lipoprotein and Hepatitis C Virus Secretion by Rab1b. *Cell Reports*, 21(2), pp.431–441.
- Takeda, H. et al., 2017. Genetic basis of hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma: linkage between infection, inflammation, and tumorigenesis. *Journal of Gastroenterology*, 52(1), pp.26–38.
- Tanaka, N., Moriya, K., Kiyosawa, K., Koike, K. & Aoyama, T., 2008. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 122(1), pp.124–131.
- Tanaka, N., Moriya, K., Kiyosawa, K., Koike, K., Gonzalez, F.J., et al., 2008. PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), pp.683–694.
- Teng, W. et al., 2019. Interferon Is Superior to Direct Acting Antiviral Therapy in Tertiary Prevention of Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 12(1).
- Toyoda, H., Kumada, T. & Tada, T., 2016. Changes in patient backgrounds may increase the incidence of HCC after SVR in the era of IFN-free therapy for HCV. *Hepatology*, 64(5), pp.1818–1819.
- Tsai, W.-C. et al., 2009. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 49(5), pp.1571–1582.
- Tukey, R.H. & Strassburg, C.P., 2000. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40(1), pp.581–616.
- Umesalma, S. et al., 2019. RABL6A inhibits tumor-suppressive PP2A/AKT signaling to drive pancreatic neuroendocrine tumor growth. *The Journal of clinical investigation*, 129(4), pp.1641–1653.
- van Zijl, F. et al., 2009. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future oncology (London, England)*, 5(8), pp.1169–1179.
- Vasallo, C. & Gastaminza, P., 2015. Cellular stress responses in hepatitis C virus infection: Mastering a two-edged sword. *Virus Research*, 209, pp.100–117.
- Velmurugan, B.K. et al., 2019. UNC13C Suppress Tumor Progression via Inhibiting EMT Pathway and Improves Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in oncology*, 9, p.728.

- Verna, E.C. & Brown, R.S., 2006. Hepatitis C virus and liver transplantation. *Clinics in liver disease*, 10(4), pp.919–940.
- Verna, E.C. et al., 2020. DAA therapy and long-term hepatic function in advanced/decompensated cirrhosis: Real-world experience from HCV-TARGET cohort. *Journal of Hepatology*, 73(3), pp.540–548.
- Wakita, T. et al., 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*, 11(7), pp.791–796.
- Walters, K.-A. et al., 2009. Genomic analysis reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured hepatocytes. *PLoS Pathogens*, 5(1), p.e1000269.
- Wang, F. et al., 2008. UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion. *FEBS Letters*, 582(13), pp.1919–1927.
- Wang, H. & Tai, A.W., 2016. Mechanisms of cellular membrane reorganization to support hepatitis C virus replication. *Viruses*, 8(5).
- Wang, H. et al., 2014. Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology*, 146(5), pp.1373–85.e1–11.
- Wang, N. et al., 2016. Downregulation of microRNA-122 promotes proliferation, migration, and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by activating epithelial-mesenchymal transition. *Oncotargets and therapy*, 9, pp.2035–2047.
- Wang, S.-C. et al., 2014. MicroRNA-122 triggers mesenchymal-epithelial transition and suppresses hepatocellular carcinoma cell motility and invasion by targeting RhoA. *PLoS ONE*, 9(7), p.e101330.
- Wang, X.-J. et al., 2020. TRIB3 promotes hepatocellular carcinoma growth and predicts poor prognosis. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 29(3), pp.307–315.
- Wang, Y. et al., 2019. MIR210HG predicts poor prognosis and functions as an oncogenic lncRNA in hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 111, pp.1297–1301.
- Waris, G., Tardif, K.D. & Siddiqui, A., 2002. Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochemical Pharmacology*, 64(10), pp.1425–1430.
- Waziry, R. et al., 2017. Hepatocellular carcinoma risk following direct-acting antiviral HCV therapy: A systematic review, meta-analyses, and meta-regression. *Journal of Hepatology*, 67(6), pp.1204–1212.
- Williams, S.H. et al., 2020. Discovery of Jogalong virus, a novel hepacivirus identified in a *Culex annulirostris* (Skuse) mosquito from the Kimberley region of Western Australia.

PLoS ONE, 15(1), p.e0227114.

Wirth, T.C. & Manns, M.P., 2016. The impact of the revolution in hepatitis C treatment on hepatocellular carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 27(8), pp.1467–1474.

Wogan, G.N., 2000. Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Seminars in Cancer Biology*, 10(3), pp.201–210.

Wogan, G.N. et al., 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), pp.473–486.

Wu, Y. et al., 2019. LncRNA MIR22HG inhibits growth, migration and invasion through regulating the miR-10a-5p/NCOR2 axis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer science*, 110(3), pp.973–984.

Wyles, D.L. et al., 2015. Daclatasvir plus Sofosbuvir for HCV in Patients Coinfected with HIV-1. *The New England journal of medicine*, 373(8), pp.714–725.

Xiu, M.-X., Liu, Y.-M. & Kuang, B.-H., 2020. The oncogenic role of Jagged1/Notch signaling in cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 129, p.110416.

Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R., 2009. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), pp.156–172.

Xu, P. et al., 2016. Bioinformatics analysis of hepatitis C virus genotype 2a-induced human hepatocellular carcinoma in Huh7 cells. *OncoTargets and therapy*, 9, pp.191–202.

Yamane, D. et al., 2014. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nature Medicine*, 20(8), pp.927–935.

Yang, C. et al., 2018. Marker of proliferation Ki-67 expression is associated with transforming growth factor beta 1 and can predict the prognosis of patients with hepatic B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer management and research*, 10, pp.679–696.

Yang, X. et al., 2019. The long noncoding RNA NORAD enhances the TGF- $\beta$  pathway to promote hepatocellular carcinoma progression by targeting miR-202-5p. *Journal of cellular physiology*, 234(7), pp.12051–12060.

Zanetto, A., Simioni, P. & Russo, F.P., 2021. Hepatic benefits of HCV cure: Don't forget coagulation! *Journal of Hepatology*, 74(4), pp.967–968.

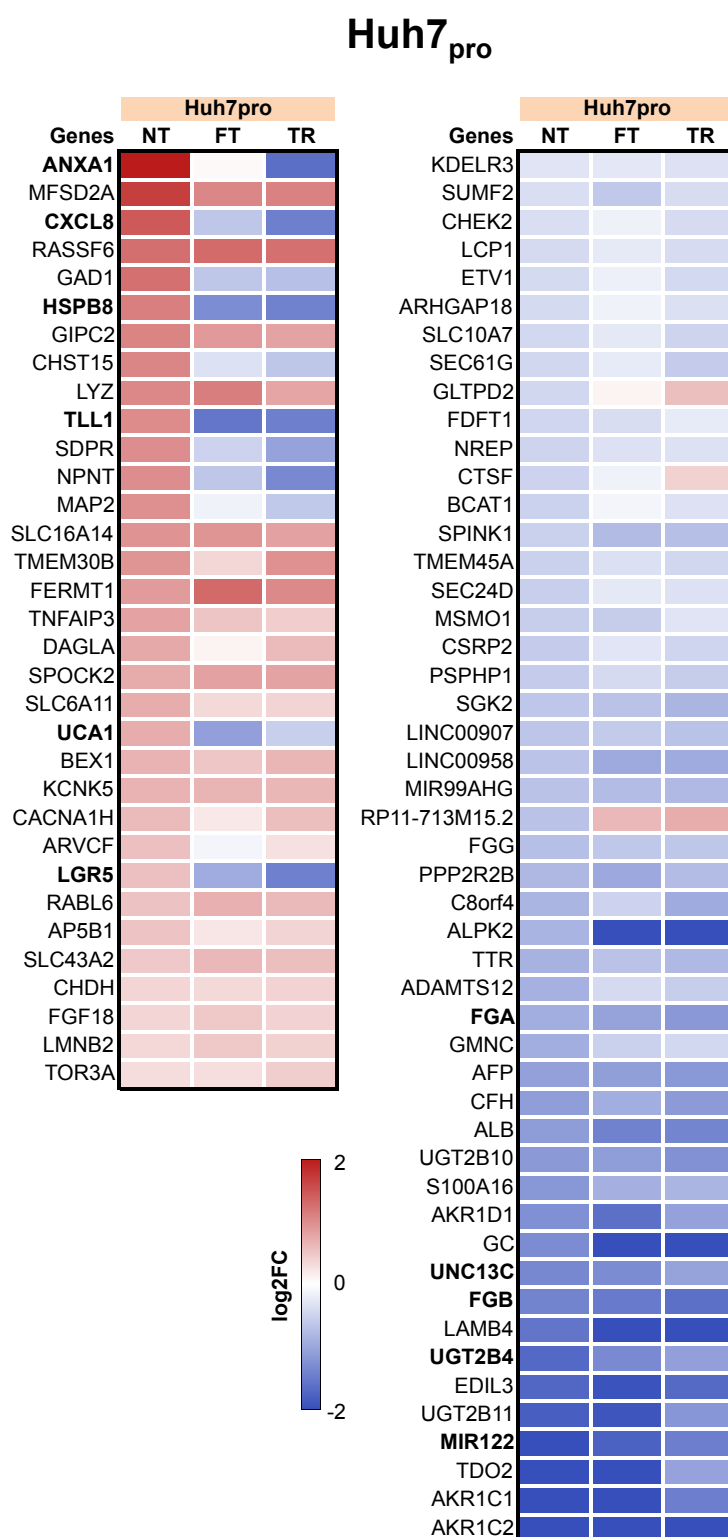
Zeuzem, S. et al., 2012. The protease inhibitor, GS-9256, and non-nucleoside polymerase inhibitor tegobuvir alone, with ribavirin, or pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C. *Hepatology*, 55(3), pp.749–758.

Zhang, C. et al., 2017. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis via Sirt1-dependent pathway. *Liver International*, 38(5), pp.803–812.

- Zhang, G. et al., 2020. LINC01419 facilitates hepatocellular carcinoma growth and metastasis through targeting EZH2-regulated RECK. *Aging*, 12(11), pp.11071–11084.
- Zhang, H. et al., 2015. Long non-coding RNA expression profiles of hepatitis C virus-related dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 6(41), pp.43770–43778.
- Zhang, Z. et al., 2019. Host Lipids in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Frontiers in microbiology*, 10(FEB), p.286.
- Zhao, L.-J. et al., 2005. Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Experimental cell research*, 305(1), pp.23–32.
- Zheng, H. et al., 2018. Single-cell analysis reveals cancer stem cell heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 68(1), pp.127–140.
- Zhong, J. et al., 2006. Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *Journal of Virology*, 80(22), pp.11082–11093.
- Zhong, J. et al., 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), pp.9294–9299.
- Zhou, H.-L., Zhou, Y.-F. & Feng, Z.-T., 2019. Long noncoding RNA ZFAS1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation by epigenetically repressing miR-193a-3p. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(22), pp.9840–9847.
- Zhou, R. et al., 2017. RASSF6 downregulation promotes the epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(33), pp.55162–55175.
- Zhu, P. et al., 2015. C8orf4 negatively regulates self-renewal of liver cancer stem cells via suppression of NOTCH2 signalling. *Nature Communications*, 6(1), pp.7122–13.



## 8. ANEXOS



**Figura S4.1. Los 82 transcritos alterados ( $FDR \leq 0.05$ ) por la infección por HCV que permanecen permanentemente alterados ( $FDR \leq 0.05$ ) tras la erradicación del virus en Huh7<sub>pro</sub>.**

## Huh7<sub>DMSO</sub>

A

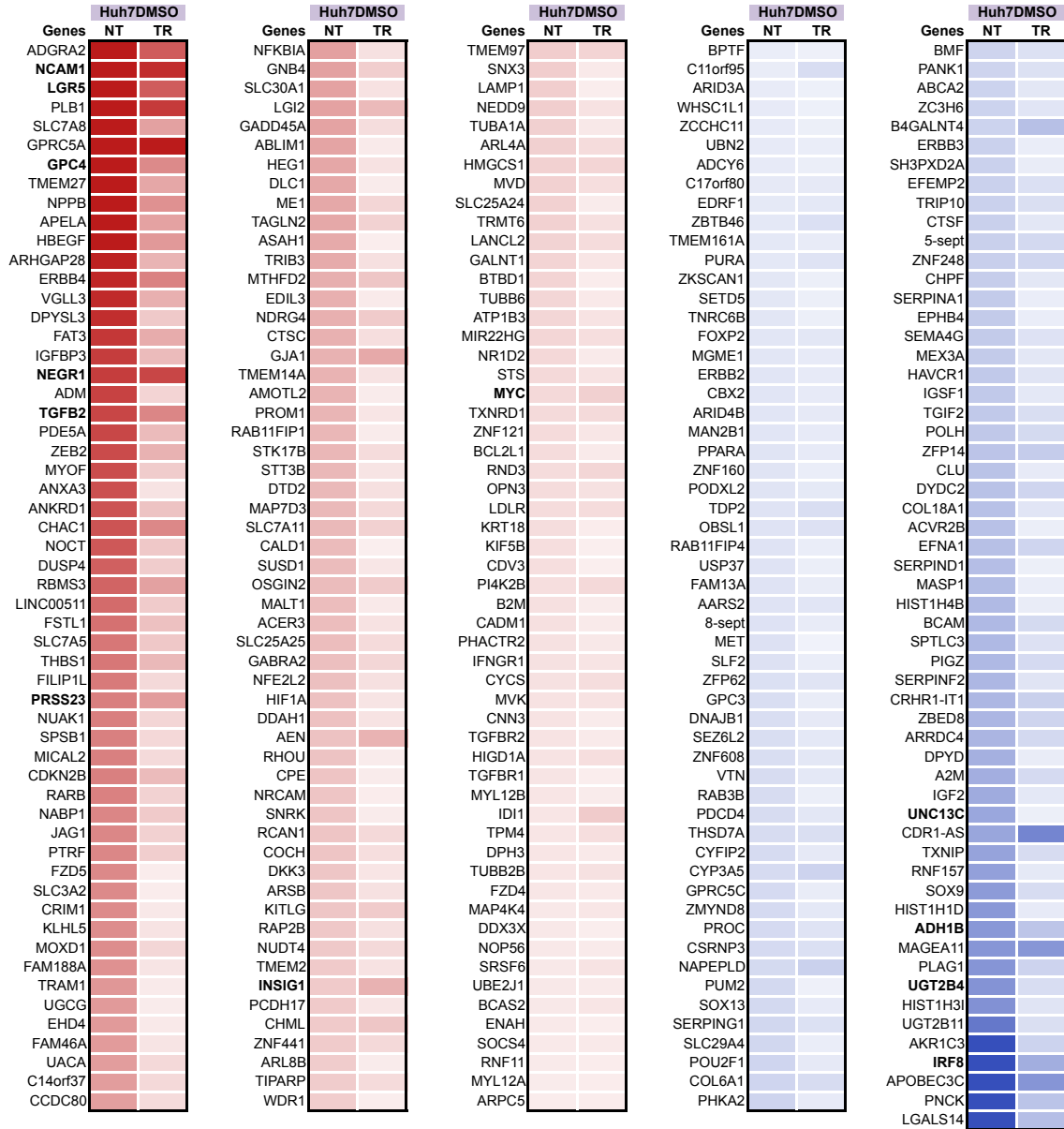
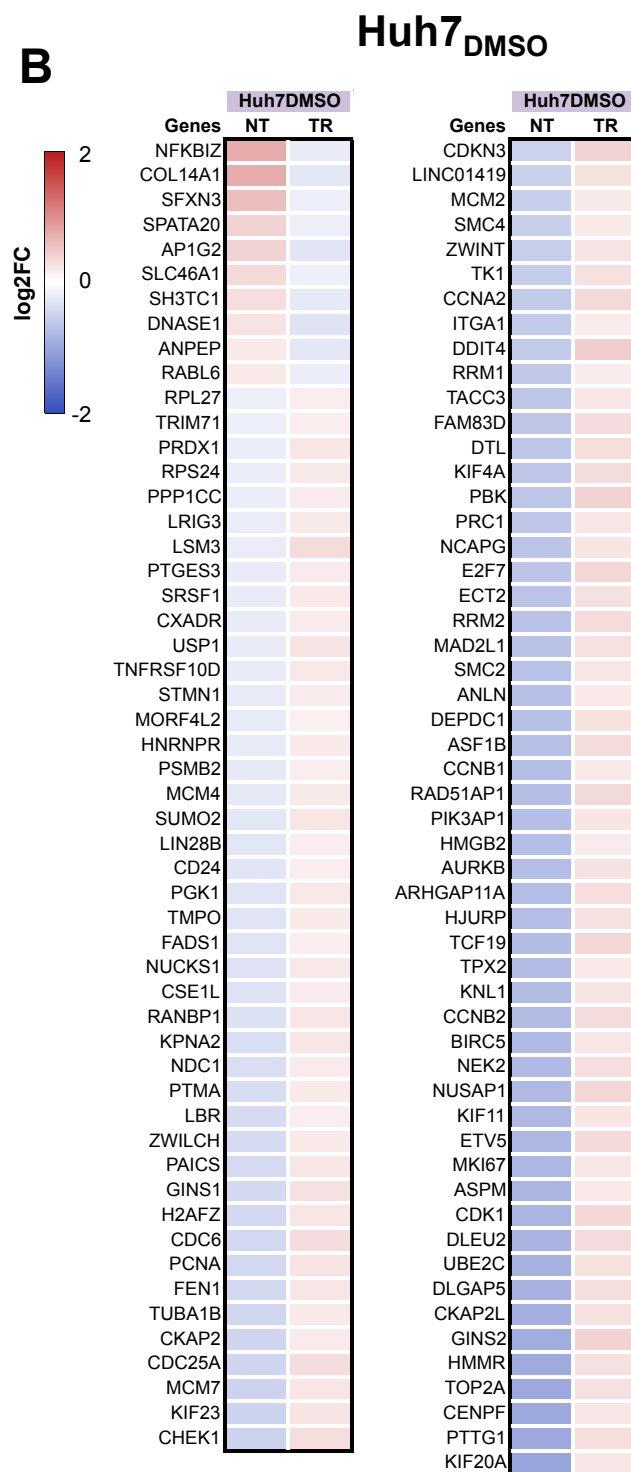
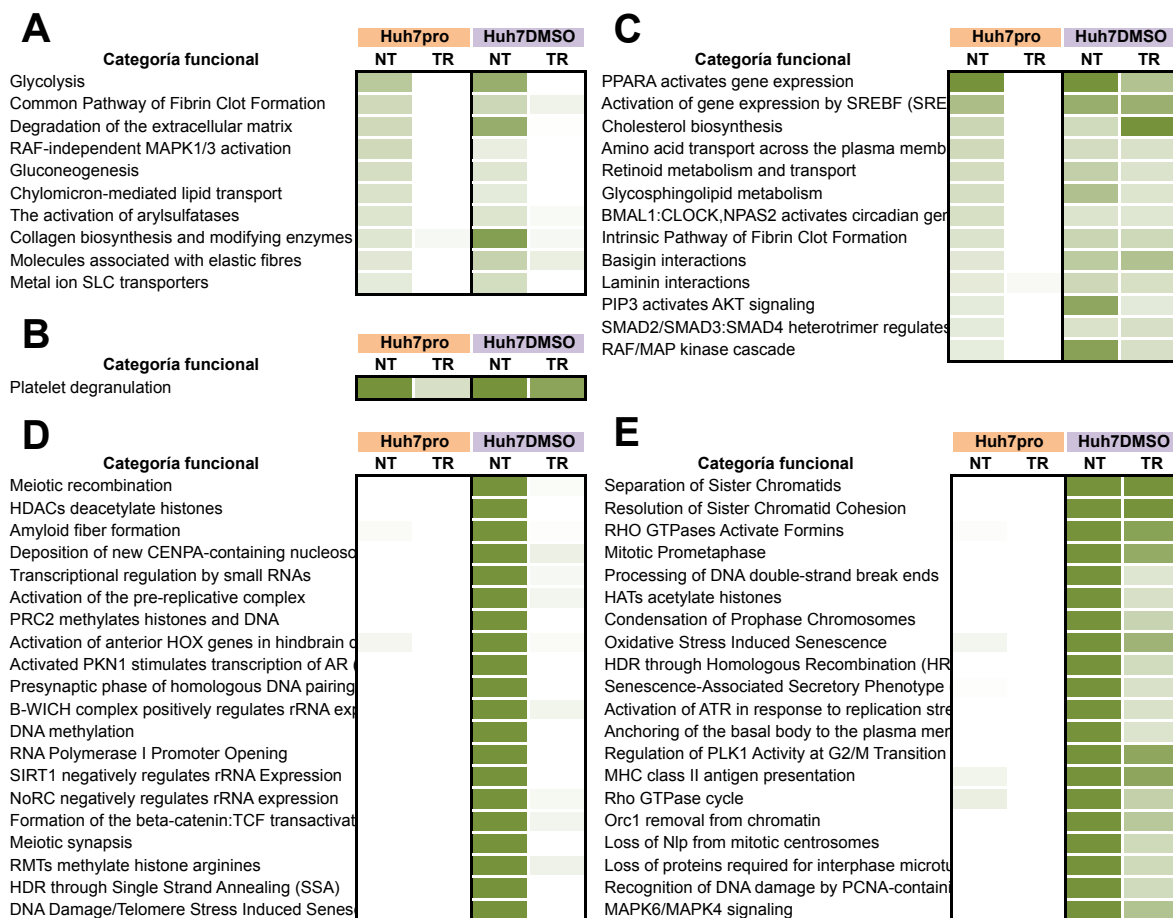


Figura S4.2A. Los 281 transcritos *permanentemente alterados* (281/388) tras la erradicación del virus en la misma dirección que durante la infección persistente (FDR  $\leq 0.05$ ).



**Figura S4.2B. Los 107 transcritos *permanentemente alterados* (107/388) tras la erradicación del virus en dirección opuesta que durante la infección persistente (FDR  $\leq 0.05$ ).**

# Reactome



**Figura S4.3. Análisis de sobrerrepresentación utilizando la base de datos Reactome.** Las categorías estadísticamente significativas se muestran como un mapa de color (blanco/verde, ver escala), con una intensidad inversamente proporcional al valor p obtenido para una categoría dada (-LOG p-valor), con un valor de corte de 1.3 ( $p \leq 0.05$ ). **A)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas durante la infección en ambos sistemas de cultivo que desaparecen tras la erradicación del virus (10). **B)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas durante la infección y que permanecen tras la erradicación del virus en ambos sistemas de cultivo (1). **C)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas durante la infección y que permanecen tras la erradicación del virus únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> (13). **D)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> que desaparecen tras la erradicación de la infección (mostradas 20 de 164). **E)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> que se mantienen tras la erradicación del virus (mostradas 20 de 112).

# Gene Ontology: Biological Process



**Figura S4.4. Análisis de sobrerrepresentación utilizando la base de datos Gene Ontology:Biological Process.** Las categorías estadísticamente significativas se muestran como un mapa de color (blanco/verde, ver escala), con una intensidad inversamente proporcional al valor p obtenido para una categoría dada (-LOG p-valor), con un valor de corte de 1.3 ( $p \leq 0.05$ ). **A)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas durante la infección en ambos sistemas de cultivo que desaparecen tras la erradicación del virus (mostradas 20 de 458). **B)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas durante la infección y que permanecen tras la erradicación del virus en ambos sistemas de cultivo (7). **C)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas durante la infección y que permanecen tras la erradicación del virus únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> (mostradas 20 de 218). **D)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas durante la infección y que permanecen tras la erradicación del virus únicamente en Huh7<sub>pro</sub> (8). **E)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> que desaparecen tras la erradicación de la infección (mostradas 20 de 1028) **F)** Categorías funcionales sobrerrepresentadas únicamente en Huh7<sub>DMSO</sub> que se mantienen tras la erradicación del virus (mostradas 20 de 259).